



IMPLICACIÓN DE LOS MICRORNAS EN LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES

CABIMER

Memoria del trabajo de investigación presentada por
D. Emilio Javier López Beas para optar al grado de Doctor.

Sevilla, 2017

Dirigida por:

Dr. Abdelkrim Hmadcha

Dr. Bernat Soria Escoms



Dr. **Bernat Soria Escoms**, Director del Departamento de Células Troncales del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) y Dr. **Abdelkrim Hmadcha**, Investigador del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER),

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación presentado por D. **Emilio Javier López Beas** titulado **“Implicación de los microRNAs en la obtención de células productoras de insulina a partir de células troncales pluripotentes”** ha sido realizado bajo su supervisión y dirección en el Departamento de Células Troncales de CABIMER, y reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para ser defendido ante un tribunal con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste y a efectos oportunos, firman el presente informe en Sevilla a 21 de Julio de 2016.

VºBº de los directores del trabajo.

Dr. Bernat Soria Escoms

Dr. Abdelkrim Hmadcha

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Regeneración y Terapia Celular del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) y con la ayuda de un contrato para la formación de Personal Investigador de la Fundación Progreso y Salud (FPS).

Durante el periodo del contrato de formación se han publicado los siguientes trabajos:

ARTÍCULOS PUBLICADOS

López-Beas, J.; Soria, B.; Hmadcha, A. MicroRNAs modulate differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing β -like cells and contribute to maturation. Manuscrito en preparación

Pezzolla, D.; López-Beas, J.; Lachaud, CC.; Domínguez-Rodríguez, A.; Smani, T.; Hmadcha, A.; Soria, B. 2015. Resveratrol ameliorates the maturation process of β -cell-like cells obtained from an optimized differentiation protocol of human embryonic stem cells. PLoS One. 10:e0119904.

Lachaud, CC.; Lopez-Beas, J.; Soria, B.; Hmadcha, A. Cell Death & Disease. 2014. EGF-induced adipose tissue mesothelial cells undergo functional vascular smooth muscle differentiation. Cell Death Dis. 5:e1304.

CAPÍTULOS DE LIBRO

Soria, B.; Pezzolla, D.; López, J.; Rojas, A.; Hmadcha, A. 2013. Principles of Tissue Engineering. Generation of Pancreatic Islets from Stem Cells. 41:837-47.

CONGRESOS

Reunión Anual del Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM). Barcelona, España. 2017. Comunicación oral. "Generating an Advanced Therapy Medicinal Product (CAB-001) using the CABIMER Differentiation Protocol" López-Beas, J.; Vakilian, M.; Capilla-González, V.; Aguilera, Y.; Escacena, N.; Tejedo, JR.; Bedoya, FJ.; Martín, F.; Soria, B.; Hmadcha, A.

Reunión anual del Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM). Barcelona, España. 2016. Póster: "In-vitro differentiation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells: The cabimer protocol". Hmadcha, A.; López-Beas, J.; Pezzolla, D.; Salguero-Aranda, C.; Tejedo, J.; Bedoya, FJ.; Martin, F.; Soria, B.

Reunión anual de la Red de Terapia celular (TerCel). Sevilla, España. 2016. Póster: "Producing mature insulin-producing cells from human pluripotent stem cells as a cell-based medicinal product". Pascual, S.; Vakilian, M.; López-Beas, J.; Mellado, N.; Aguilera, Y.; Escacena, N.; Jiménez, V.; Gálvez, M.; Soria, B.; Hmadcha, A.

International Society for Stem Cell Research (ISSCR): Annual International Meeting. Estocolmo, Suecia. 2015. Póster: "microRNAs modulate differentiation in mouse and human embryonic stem cells into insulin-producing cells and contribute to maturation". López-Beas, J.; Lachaud, CC.; Aguilera, Y.; Mellado, N.; Hmadcha, A.; Soria, B.

Reunión anual de la Red de Terapia celular (TerCel). Sevilla, España. 2015. Póster: "MicroRNAs modulate differentiation in human embryonic stem cells into insulin producing β -like cells and contribute to maturation". López-Beas, J.; Lachaud, CC.; Aguilera, Y.; Mellado, N.; Hmadcha, A.; Soria, B.

Reunión anual del Grupo de Trabajo de Islotes Pancreáticos de la Sociedad Española de Diabetes (SED). Madrid, España. 2014. Comunicación oral: "Los microRNAs modulan la diferenciación de las células troncales embrionarias hacia células productoras de insulina". López-Beas, J.; Soria, B.; Hmadcha, A.

The European Summer School on Stem Cells & Regenerative Medicine. Hydra, Grecia. 2014. Póster: "microRNAs modulate differentiation in mouse and human embryonic stem cells into insulin-producing cells and contributes to maturation". López-Beas, J.; Pezzolla, D.; Aguilera, Y.; Mellado, N.; Hmadcha, A.; Soria, B.

"No tengo ningún talento en especial, sólo soy apasionadamente curioso".

Albert Einstein

**A mi familia y mis dos estrellas del cielo,
que siempre iluminan mi camino,
Teodora y Manuel.**

Agradecimientos

Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el impulso de todas aquellas personas que me han ayudado personalmente en el desarrollo de un trabajo de esta índole, comenzando por sus directores, los doctores Abdelkrim Hmadcha y Bernat Soria, quienes confiaron en mí y me dieron la oportunidad de realizar uno de los retos más importantes de mi vida en el Departamento de Regeneración y Terapia Celular del CABIMER. Agradecer a Karim su dedicación y estímulo, además de sus siempre acertados consejos y de mantener siempre abierta la puerta para ayudar en todo lo posible y al doctor Tarik Smani, tutor del programa de doctorado, por su vinculación e interés.

A todos los integrantes del grupo, por su paciencia, sobre todo en los inicios cuando necesité su estrecha colaboración para ampliar mis conocimientos y aptitudes en el laboratorio y poder valerme por mi mismo. Nuria y Yolanda, por vuestra fundamental labor en este grupo y la inestimable ayuda que nos proporcionáis, siempre dispuestas a colaborar con nuestro trabajo. Mis dos compañeras de fatigas durante mucho tiempo, a un lado Daniela que fue marcando el camino para que todo me fuera un poco más fácil y que nos alegraba los días con su mano especial en la repostería y ese tiramisú que nunca olvidaremos y al otro Natalia, dispuesta siempre a colaborar en todo lo que esté en su mano y que desprende un halo de constancia y esfuerzo que contagia a quien la rodea. Christian por compartir su amplio conocimiento conmigo que me ha hecho aprender y mejorar con acertadas sugerencias, y con esos “ingenios” que nos hacen la vida un poco más fácil en el laboratorio. Las últimas y grandes incorporaciones al grupo con Vivian que ha transmitido optimismo y positividad desde su llegada, y que con su experiencia me ha ayudado mucho en la recta final del trabajo para culminarlo de la mejor forma posible, Sandra que aunque por menos tiempo del que nos habría gustado,

nos contagiaba con su alegría cada día y Mehrdad al que espero pueda tener la misma suerte de la que yo he disfrutado para realizar su trabajo aquí.

A las chicas de GMP, Patri siempre dispuesta a orientar mi camino dándome las pautas para dar con la dirección correcta y estoy seguro que podré contar siempre con sus consejos si necesito enderezar el rumbo. María y Vicky con las que tengo la suerte de poder compartir tantos buenos momentos, especialmente durante nuestras comidas al sol tan necesarias para despejar la mente cada día.

No me quiero olvidar de los que ya no forman parte del grupo pero que en su día fueron también muy importantes como Lourdes y Ángela, que me recibisteis a mi llegada con los brazos abiertos, haciendo que mi adaptación tanto personal como profesional fuera lo mejor posible, ya fuera en el laboratorio con un café o fuera con una, dos o... las cervezas que hicieran falta y al resto de personas que durante este tiempo he tenido la suerte de conocer y compartir momentos en el laboratorio como Inés, Inma, Virginia y Esther. A todos ellos espero que encontréis lo que buscáis y os vaya genial allá donde vayáis.

Agradecer también a todos los técnicos y el resto de componentes de CABIMER, profesionales altamente cualificados e interesados en solventar cuantos problemas se me han planteado durante el trabajo de investigación. Especialmente, Elo y Mónica técnicos de la Unidad de Genómica, proporcionándome un apoyo fundamental en la realización de los Microarrays que tan valiosa información me han proporcionado, Paloma por su paciencia en el confocal aconsejando y guiándonos hasta conseguir encontrar lo que buscamos y Merche, por atender cualquier duda en las salas de cultivo en las que tantas horas he pasado.

A mi amiga, compañera y amor, Pilar, por su infinita paciencia y creer siempre en nosotros desde que nos conocimos, haciendo que hoy sea una de las personas más felices de este mundo. Gracias por apoyarme en todas mis decisiones y estar siempre a

mi lado durante este largo camino, gran parte de este trabajo también ha sido mérito tuyo.

A mi familia, mi hermana Tania y mi cuñado Rubén por estar siempre ahí para apoyarme y darme a mis dos maravillosos sobrinos, Violeta y Rubén, de los que cada día estoy más orgulloso. Mis dos estrellas en el cielo, mis tíos Teodora y Manuel, que durante toda su vida me cuidaron y se desvivieron para que nunca me faltará nada, con los que me hubiera gustado compartir este momento, pero que sé que desde ahí arriba me están viendo y dando su apoyo. Por supuesto, a mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMEN	VII
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	3
1.2. DIABETES MELLITUS	5
1.2.1. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES	5
1.2.2. PREVALENCIA Y DIAGNÓSTICO	10
1.2.3. TRATAMIENTO DE LA DIABETES	13
1.3. EL PÁNCREAS	18
1.3.1. DESARROLLO ENDODÉRMICO: ORIGEN DEL PÁNCREAS	20
1.3.2. PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA QUE REGULAN EL DESARROLLO DEL PÁNCREAS	22
1.4. CÉLULAS TRONCALES	26
1.4.1. ¿QUÉ ES UNA CÉLULA TRONCAL?	26
1.4.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES	27
1.4.3. CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS (CTEs)	30
1.5. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS CTEs	32
1.5.1. CONTROLES INTRÍNSECOS	33
1.5.2. CONTROLES EXTRÍNSECOS	36
1.6. DIFERENCIACIÓN DE LAS CTEs HACIA CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA	38
1.6.1. DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA	39
1.6.2. DIFERENCIACIÓN DIRIGIDA	39
1.6.3. PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN	42
1.7. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LAS CTEs	45
1.8. LAS MOLÉCULAS REGULADORAS DE RNA NO CODIFICANTE (ncRNAs)	48
1.9. LOS PEQUEÑOS RNAs NO CODIFICANTES: MICRORNAs	50
1.9.1. BIOGÉNESIS DE LOS MIRNAs	52
1.9.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS MIRNAs	55
1.9.3. LOS MIRNAs Y LA AUTORRENOVACIÓN DE LAS CTEs	57
1.9.4. LOS MIRNAs Y LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LAS CTEs	61
1.9.5. USO DE LOS MIRNAs EN LA REPROGRAMACIÓN CELULAR	64
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIALES Y MÉTODOS	73

3.1. BIOÉTICA Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	75
3.1.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS A PARTIR DE TEJIDOS DE ORIGEN MURINO	75
3.2. CULTIVO CELULAR	76
3.2.1. LÍNEAS CELULARES CULTIVADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	76
3.2.2. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	78
3.3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS MIRNAS	81
3.3.1. OBTENCIÓN DE LOS MIRNAS: <i>POOL</i> DE MIRNAS Y MIRNAS SINTÉTICOS	81
3.3.2. TRANSFECCIÓN DE LOS MIRNAS	82
3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	84
3.4.1. EXTRACCIÓN DEL RNA	84
3.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN O TRANSCRIPCIÓN INVERSA	85
3.4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR)	86
3.4.4. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR)	89
3.4.5. MICROARRAY DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MIRNAS	92
3.4.6. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> (ISH) DE MIRNAS	94
3.4.7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	95
3.4.8. ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE	96
3.4.9. TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS: WESTERN BLOT (WB)	96
3.4.10. INMUNOFLUORESCENCIA (IF)	98
3.4.11. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	99
3.4.12. FOSFATASA ALCALINA	99
3.5. MICROSCOPIA	100
3.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	100
3.6.1. ANÁLISIS PREDICTIVO DE DIANAS DE MIRNAS	101
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
 4. RESULTADOS	 105
 4.1. CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES PLURIPOTENTES	 107
4.2. EL PÁNCREAS Y LAS PEQUEÑAS MOLÉCULAS DE NCRNA	110
4.2.1. LAS PEQUEÑAS MOLÉCULAS DE NCRNA EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CTES	110
4.2.2. EXPRESIÓN DE LOS MIRNAS CARACTERÍSTICOS DEL PÁNCREAS	117
4.3. ANÁLISIS DE MIRNAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CTES	120
4.3.1. DIFERENCIACIÓN DE LAS CTES HACIA CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA	120
4.3.2. PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS MIRNAS EN LAS CTES	126
4.3.3. LOS MIRNAS Y LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CTES	131
4.3.4. LOS MIRNAS Y LOS ISLOTES PANCREÁTICOS	134

4.4. LOS MIRNAS Y LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE CTES	142
4.4.1. SELECCIÓN DE LOS MIRNAS PANCREÁTICOS CANDIDATOS	142
4.4.2. MECANISMOS DE INDUCCIÓN Y SUPRESIÓN DE LOS MIRNAS PANCREÁTICOS EN LAS CTES	146
4.4.3. EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE LOS MIRNAS PANCREÁTICOS	149
5. DISCUSIÓN	161
5.1. POTENCIAL REGULADOR DEL <i>POOL</i> DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS DE NCRNA PANCREÁTICAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CTES MURINAS	164
5.2. LOS MIRNAS PANCREÁTICOS	171
5.3. IMPLICACIÓN DE LOS MIRNAS EN LAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS	175
5.4. LOS MIRNAS Y LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CTES: IMPLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA	179
5.5. UTILIDAD DE LOS MIRNAS EN LA DIFERENCIACIÓN PANCREÁTICA DE LAS CTES	189
6. CONCLUSIONES	201
7. BIBLIOGRAFÍA	205

RESUMEN

La diabetes mellitus es un desorden metabólico que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina dando lugar a la incapacidad para mantener la normoglucemia, desencadenando una situación de hiperglucemia crónica que produce daños a corto y largo plazo en muchos órganos y sistemas del organismo. Un aspecto central en el desarrollo de la diabetes es la reducción en el número de células beta pancreáticas que son las encargadas de producir insulina. Las limitaciones del tratamiento actual de la diabetes han estimulado la búsqueda de terapias que permitan restaurar la masa celular beta perdida para conseguir alcanzar la normoglucemia. La diferenciación de las células troncales pluripotentes hacia células productoras de insulina permitiría disponer de una fuente inagotable de células para una terapia alternativa. Sin embargo, los métodos disponibles hasta el momento presentan varios inconvenientes como son un bajo rendimiento, una difícil reproducibilidad y baja eficacia con la generación de células con un fenotipo inmaduro. Nuestro grupo fue pionero en demostrar que las células troncales embrionarias (CTEs) murinas pueden diferenciarse *in vitro* hacia células productoras de insulina y revertir *in vivo* la glucemia en modelos murinos diabéticos, estudios posteriores han demostrado que los protocolos de diferenciación *in vitro* pueden ser optimizados mediante el uso de diversos factores de crecimiento para aumentar la eficacia y eficiencia, consiguiendo células beta pancreáticas maduras funcionales en cantidad suficiente para una posible terapia celular. Sin embargo, las etapas de maduración son susceptibles de mejoras y además los factores necesarios para el proceso de diferenciación son extremadamente caros, esto ha suscitado un gran interés por la investigación de los microRNAs (miRNAs) como factores clave en la diferenciación que podrían sustituirlos.

La propuesta en este trabajo de investigación gira en torno a una mejora de la eficacia y eficiencia del proceso de diferenciación de las células troncales pluripotentes hacia células productoras de insulina, mediante un mecanismo regulador innovador ejercido por pequeñas moléculas de RNAs no codificantes como son los miRNAs, de forma que podrán constituir herramientas moleculares útiles en la manipulación de las CTEs. En nuestro trabajo, identificamos el perfil de expresión específico de miRNAs en las células troncales pluripotentes (Familia miR-302) y durante el proceso de diferenciación para obtener células productoras de insulina (miR-7, -375, -373, -15a/b, -16, -148a y -29b), así como aquellos miRNAs con una expresión preferente en los islotes pancreáticos, entre los que destacan miR-7 y -375, que varios trabajos sitúan como dos de los miRNAs más abundantes en páncreas, necesarios para un correcto desarrollo pancreático. Los resultados obtenidos revelan que miR-7 posee un importante papel en la obtención de células productoras de insulina a partir de células troncales, mejorando la sensibilidad de las células obtenidas a la liberación de insulina dependiente de los estímulos de glucosa.

En conclusión, la generación de células productoras de insulina mediante miRNAs específicos en ausencia de factores de crecimiento resulta por el momento una meta lejana de alcanzar. Sin embargo, la mejora en los procesos de maduración para obtener células completamente funcionales mediante la combinación de factores de crecimiento y miRNAs es prometedora, aunque constituye un enfoque que se enfrenta a múltiples desafíos. Los próximos años revelarán el potencial real de los miRNAs como nuevas herramientas para la prevención y el tratamiento de la diabetes, revolucionando muchos de los actuales modelos en ciencias biomédicas.

ABREVIATURAS

Ab	Antibody (Anticuerpo)
ABCA1	ATP binding cassette subfamily A member 1 (Miembro 1 de la subfamilia A de casetes de union a ATP)
ACTB	Actin, beta (Beta actina)
Acvr2a	Activin receptor type-2A (Receptor de Activina tipo 2A)
ADA	American diabetes association (Asociación americana de diabetes)
ADP	Adenosine diphosphate (Adenosín difosfato)
Ago	Proteína argonauta
Ago2	proteína argonauta-2
AKT	Serine/threonine kinase 1 (Serina/treonina quinasa 1)
AMY2A5	Amylase 2a5 (Amilasa)
ANOVA	Analysis of variance (Análisis de variación)
AP	Alkaline phosphatase (Fosfatasa alcalina)
APC	Adenomatous polyposis coli
ATP	Adenosine triphosphate (Adenosín trifosfato)
AU	Arbitrary units (Unidades arbitrarias)
BCL2	B cell leukemia/lymphoma 2 (Linfoma de células B 2)
bFGF	Basic fibroblast growth factor (Factor de crecimiento fibroblástico básico)
BHLHE22	Basic helix-loop-helix family, member e22 (Miembro e22 de la familia hélice-bucle-hélice básica)
BMP	Bone morphogenic protein (Proteína morfogénica ósea)
BMP2	Bone morphogenic protein-2 (Proteína morfogénica ósea-2)
BMP4	Bone morphogenic protein-4 (Proteína morfogénica ósea-4)
BSA	Bovine serum albumin (Albúmina sérica bovina)
CALB1	Calbindin 1 (Calbindina 1)
Cap-5'	Caperuza 5'
CAV2	Caveolin 2 (Caveolina 2)
CCDC18	Coiled-coil domain containing 18
CDKs	Cyclin-dependent kinases (Quinasas dependientes de ciclinas)
cDNA	DNA complementario
CIBERDEM	Centro de investigación biomédica en red de diabetes y enfermedades metabólicas
CIE-10	Clasificación internacional de enfermedades
c-MYC	Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (Homólogo del oncogen viral Avian Myelocytomatosis)
CRYBB2	Crystallin beta B2 (Cristalina beta B2)
Ct	Cycle threshold (Ciclo umbral)
CTAs	Células troncales adultas
CTEs	Células troncales embrionarias
CTNNB	Catenin, beta (Beta catenina)
CTRB1	Chymotrypsinogen B1 (Quimiotripsinógeno B1)
DD-CTEs	Diferenciación dirigida de células troncales embrionarias
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8 (Región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge)
DMEM	Dulbecco's modified eagle médium (Medio Eagle modificado de Dulbecco)
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle medium: Nutrient mixture F-12 (Medio Eagle modificado de Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12)
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMID	Diabetes mellitus insulín dependiente

DMNID	Diabetes mellitus no insulindpendiente
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxiribonucleico)
DNAJC3	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3 (Miembro C3 de la familia de proteínas de DNA de choque térmico)
DSH	Dishevelled
EBs	Embryoid bodies (Cuerpos embrionarios)
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) hidrocioruro de carbodiimida)
EDG	Endothelial differentiation gene (Gen de diferenciación endotelial)
ESCC	Embryonic stem cell-cicle (Ciclo celular de células troncales)
EVP	Enfermedad vascular periférica
FBS	Fetal bovine serum (Suero fetal bovino)
FDA	Food and drug administration (Agencia de alimentos y medicamentos)
FED	Federación española de diabetes
FGF	Fibroblast growth factor (Factor de crecimiento fibroblástico)
FID	Federación internacional de diabetes
FLK1	Fetal Liver Kinase 1 (Quinasa 1 de hígado fetal)
FOXA2	Forkhead box A2
FRZ	Frizzled
GCG	Glucagon
GCNT2	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme
GDFs	Growth differentiation factors (Factores de crecimiento y diferenciación)
GFF	Glass fiber filter (Filtro de fibra de vidrio)
GLUT2	Solute carrier family 2 member 2 (Miembro 2 de la familia de transportadores de soluto)
GSC	Goosecoid
GSIS	Glucose-stimulated insulin secretion (Secreción de insulina estimulada por glucosa)
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta (Glucógeno sintasa quinasa-3 beta)
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HGF	Hepatocyte growth factor (Factor de crecimiento de hepatocitos)
hiPSC	Human induced pluripotent stem cells (Células troncales pluripotentes inducidas humanas)
HLA	Human Leukocyte Antigen (Antígenos leucocitarios humanos)
HMG	High-Mobility Group (Grupo de alta movilidad)
HNF1β	HNF1 homeobox B
HNF4α	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (Factor de hepatocito nuclear 4 alfa)
hrbFGF	Recombinant human basic fibroblast growth factor (Factor de crecimiento fibroblástico básico humano recombinante)
IAPP	Islet amyloid polypeptide (Polipéptido amieloide de los islotes)
ICAs	Islet cell antibodies (Anticuerpos Antiislotes Pancreáticos)
IF	Inmunofluorescencia
IFG	Impaired fasting glycemia (Glicemia alterada en ayunas)
IGF1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor (Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1)
IGT	Impaired glucose tolerance (Intolerancia a la glucosa)
IND	International nomenclature of diseases (Nomenclatura internacional de enfermedades)
INS	Insulina
INS-I	Insulina-I
INSIG1	Insulin induced gene 1 (Gen 1 inducido por insulina)

IRS2	Insulin receptor substrate 2 (Receptor de sustrato de insulina 2)
ISH	In situ hybridization (Hibridación <i>in situ</i>)
ISL1	ISL LIM homeobox 1
ITS	Insulina-Transferrina-Selenio
JAZF1	JAZF zinc finger 1
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor (Factor potenciador linfoide)
LIF	Leukemia inhibitory factor (Factor inhibitorio de leucemia)
lncRNA	Long non-coding RNA (RNA largo no codificante)
MAFA	MAF bZIP transcription factor A (Factor de transcripción A MAF bZIP)
MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase 4 (Proteína quinasa activada por mitógenos tipo 4)
MCI	Masa Celular Interna
MCL1	Myeloid cell leukemia 1 (Célula de leucemia mieloide tipo 1)
MCT1	Solute carrier family 16 member 1 (Miembro 1 de la familia 16 de transportadores de monocarboxilato)
MEC	Matriz extracelular
miRISC	miRNA-induced silencing complex (Complejo de silenciamiento inducido por miRNA)
miRNAs	microRNAs
MIST1	Basic helix-loop-helix family, member a15 (Miembro a15 de la familia hélice-bucle-hélice básica)
M-MLV RT	Moloney murine leukemia Virus reverse transcriptase (Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney)
MODY	Maturity-onset diabetes of the young (Diabetes del adulto de inicio en la juventud)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mTOR	Mammalian target of rapamycin (Diana de rapamicina en mamífero)
MTPN	Myotrophin (Miotrofina)
NB	Técnica de Northern Blotting
ncRNA	Non-coding RNA (RNA no codificante)
NDDG	National Diabetes Data Group (Grupo nacional de datos de diabetes)
NEUROD1	Neurogenic Differentiation Factor (Factor de diferenciación neurogénico)
NEUROG3	Neurogenin 3 (Neurogenina 3)
NFκB	Nuclear factor kappa-B (Factor nuclear kappa-B)
NKX2.2	NK2 homeobox 2
NKX6.1	NK6 homeobox 1
OC-2	One cut homeobox 2
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4 (Factor de transcripción-4 de unión a octámero)
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Open reading frame (Marco de lectura abierto)
PAK6	p21 (RAC1) activated kinase 6 (Quinasa activada por p21 tipo 6)
PAX4	Paired box 4 (Caja emparejada de genes-4)
PAX6	Paired box 6 (Caja emparejada de genes-6)
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (Tampón fosfato salino)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PDGF	Platelet-derived growth factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)
PK1	Pyruvate dehydrogenase kinase-1 (Quinasa dependiente de fosfoinositol-1)
PDX1	Pancreatic and duodenal homeobox 1 (Factor homeobox tipo 1 pancreático y duodenal)
PGCs	Primordial germ cells (Células germinales primordiales)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase (Fosfoinositol 3-quinasa)

PIP2	Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato)
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato)
piRNAs	Piwi-interacting RNA (RNA de interacción con PIWI)
PKB	Protein kinase B (Proteína quinasa B)
PLCγ	Phosphoinositide phospholipase C gamma (Fosfoinositida fosfolipasa C gamma)
PLEKHH1	Pleckstrin homology, MyTH4 and FERM domain containing H1
PPY	Pancreatic polypeptide (Polipéptido pancreático)
PRDM1	PR domain 1 (Dominio PR-1)
PRKRA	Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A (Proteína quinasa activadora A dependiente de RNA inducible por interferón)
PTF1A	Pancreas specific transcription factor, 1a (Factor de transcripción específico del páncreas)
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
RBM47	RNA binding motif protein 47 (Proteína-47 con motivo de unión a DNA)
RBPM52	RNA binding protein with multiple splicing 2 (Proteína de unión a DNA con multiple splicing-2)
RISC	RNA-induced Silencing Complex (Complejo de silenciamiento inducido por RNA)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
RNU48	Small nucleolar RNA box 48 (Pequeño RNA nucleolar caja-48)
RPLP	50S ribosomal protein L16 (Proteína ribosomal 50S L16)
rpm	Revoluciones por minuto
RPS6KB1	Ribosomal protein S6 kinase B1
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)
S1P	Sphingosine-1-phosphate (Esfingosina-1-fosfato)
SD-CTEs	Diferenciación espontanea de células troncales embrionarias
SED	Sociedad española de diabetes
SEM	Standard error of mean (Error estándar de la media)
Shh	Sonic Hedgehog
siRNAs	Small interfering RNA (RNA pequeño de interferencia)
SIRT1	Sirtuin 1
SOX1	SRY (Sex determining region Y)-box 1 (Región determinante del sexo Y-caja-1)
SOX17	SRY (Sex determining region Y)-box 17 (Región determinante del sexo Y-caja-17)
SOX2	SRY (Sex determining region Y)-box 2 (Región determinante del sexo Y-caja-2)
SOX6	SRY (Sex determining region Y)-box 6 (Región determinante del sexo Y-caja-6)
SPHK	Sphingosine kinase (Esfingosina quinasa)
SSEA-4	Stage-specific embryonic antigen-4 (Antígeno-4 específico del estadio embrionario)
SST	Somatostatina
STX1A	Syntaxin 1A (Sintaxina 1A)
STZ	Streptozotocin (Estreptozotocina)
TBP	TATA-box binding protein (Proteína de unión a caja TATA)
TBS	Tris-buffered saline (Tampón Tris salino)
TCF	T-cell factor (Factor de células T)
TGF-β	Transforming growth factor beta (Factor de crecimiento transformante beta)
TNFα	Tumor necrosis factor α (Factor de necrosis tumoral α)
TRBP	TAR RNA-binding protein (Proteína de unión a RNA en respuesta a trans-activación)
TUBB	Tubulin beta class I (Tubulina beta clase 1)
TXNIP	Thioredoxin-interacting protein (Proteína de interacción con tioredoxina)

UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2 (Proteína de desacoplamiento mitocondrial-2)
UTR	Untranslated región (Región no traducida)
WB	Técnica de Western Blotting
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1 (Factor homeobox-1 con dedo de Zinc de unión a caja-E)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La diabetes mellitus es un desorden metabólico que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina dando lugar a la incapacidad para mantener la normoglucemia, desencadenando una situación de hiperglucemia crónica que produce daños a corto y largo plazo en muchos órganos y sistemas del organismo, especialmente los vasos sanguíneos y los nervios. Un aspecto central en el desarrollo de la diabetes es la reducción en el número de células beta pancreáticas que son las encargadas de producir insulina. En el caso de la diabetes tipo 1 la destrucción progresiva de las células beta pancreáticas da lugar a una reducción en términos absolutos de la masa celular beta. En la diabetes tipo 2, la función y masa de células beta pancreáticas es insuficiente para hacer frente al aumento en la demanda de insulina generado por la resistencia a la insulina. La forma más común de esta enfermedad es la diabetes tipo 2 y representa el 90% de los casos mundiales, presentando una alta morbilidad y una prevalencia en aumento, muy en relación con los malos hábitos de vida y el incremento de la obesidad, la cual triplica el riesgo de desarrollar una diabetes.

Cada año más de 4 millones de personas mueren por la diabetes y decenas de millones sufren complicaciones incapacitantes y potencialmente letales. Se trata de una enfermedad metabólica que afecta a más de 415 millones de personas en todo el mundo de acuerdo a la reciente información de la séptima edición del Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (FID). Según el estudio Di@betes.es, uno de los últimos estudios publicados sobre prevalencia de la diabetes, realizado por el Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM), en colaboración con la Sociedad Española de Diabetes (SED) y la Federación Española de Diabetes (FED), sitúan la prevalencia total de diabetes tipo 2 en España y Andalucía alrededor del 14 y el 15% de los adultos respectivamente (Soriguer et al., 2012). Los afectados son subsidiarios de tratamiento con insulina y presentan

complicaciones similares a largo plazo (ceguera, fallo renal, amputación del pie diabético, etc.) (Sordi et al., 2008). Las limitaciones del tratamiento actual de la diabetes han estimulado la búsqueda de terapias que permitan restaurar la masa celular beta perdida para conseguir alcanzar la normoglucemia. El trasplante alógeno de islotes pancreáticos procedentes de donantes cadáver por el protocolo de Edmonton (Shapiro et al., 2006) ha demostrado que la terapia celular funciona, de forma que el trasplante de células productoras de insulina a pacientes diabéticos normaliza la glucemia entre 1 y 5 años. Sin embargo, este tratamiento tiene unas limitaciones como son la carencia de suficientes donantes y la necesidad de inmunosupresión (Sutherland et al., 2001; Shapiro et al., 2006).

La diferenciación de las células pluripotentes hacia células productoras de insulina permitiría disponer de una fuente inagotable de células. Por lo tanto, será fundamental conseguir un aumento en la eficacia y eficiencia del proceso de diferenciación de células pluripotentes hacia células productoras de insulina, junto con la mejora del proceso y su uso en modelos animales. Las células troncales embrionarias (CTEs) murinas pueden diferenciarse hacia células productoras de insulina (León-Quinto et al., 2004; Soria et al., 2000). Estudios posteriores han demostrado que el protocolo de diferenciación *in vitro* puede optimizarse (Vaca et al., 2006) e incluso aplicarse a células troncales embrionarias humanas (D'Amour et al., 2005, 2006; Rezania et al., 2014; Pagliuca et al., 2014; Pezzolla et al., 2015). Sin embargo, los métodos disponibles hasta el momento presentan varios inconvenientes como son un bajo rendimiento, una difícil reproducibilidad y baja eficacia con la generación de células con un fenotipo inmaduro. Los procedimientos descritos con las CTEs tienen una eficacia y una eficiencia bajas, es un procedimiento poco eficaz porque el fenotipo al que se llega no es el de una célula beta pancreática madura y es poco eficiente por que el rendimiento en términos de biomasa es bajo.

1.2. Diabetes Mellitus

El término diabetes describe un trastorno metabólico de etiología múltiple caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas como consecuencia de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos. Los efectos de la diabetes incluyen daños a largo plazo que producen la disfunción e insuficiencia de varios órganos y puede presentarse con síntomas característicos como sed, poliuria, distorsión de la visión y pérdida de peso, pudiendo desarrollar en sus formas más severas, cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetónico y dar lugar a estupor, coma y en ausencia de tratamiento eficaz, la muerte. A menudo los síntomas no son graves o pueden estar ausentes y por consiguiente el grado de hiperglucemia suficiente para ocasionar cambios patológicos y funcionales puede estar presente durante un largo tiempo antes de realizarse el diagnóstico. Los efectos a largo plazo de la diabetes, incluyen el desarrollo progresivo de complicaciones específicas microvasculares (lesiones de los vasos sanguíneos pequeños) y macrovasculares (lesiones de vasos sanguíneos más grandes). Varios procesos patogénicos están implicados en el desarrollo de diabetes, esto incluye procesos los cuales destruyen las células beta pancreáticas del páncreas con la consiguiente insuficiencia de insulina. Las anomalías en carbohidratos, grasas y el metabolismo de proteínas se deben a la acción deficiente de la insulina en los tejidos diana resultante por la disminución en la sensibilidad y/o falta de insulina.

1.2.1. Clasificación de la diabetes

La primera clasificación ampliamente aceptada de la diabetes fue publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1979 (National Diabetes Data Group, 1979). El Comité de Expertos propuso entonces como clases principales de diabetes la Diabetes mellitus insulín dependiente (DMID) y Diabetes mellitus no insulín dependiente (DMNID), que sería modificada posteriormente en 1985 (WHO Study Group, 1985) como tipo 1 y tipo 2, respectivamente. Otros tipos como la intolerancia a la glucosa (IGT) o la diabetes

mellitus gestacional (DMG) fueron reflejados en la posterior Nomenclatura Internacional de Enfermedades (IND) en 1991 y en la décima revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) en 1992. En 1997 (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003), los criterios de clasificación y diagnóstico de la diabetes elaborados por el Grupo Nacional de Datos de Diabetes (NDDG) y recomendados por la OMS, han sido revisados por el Comité de Expertos para el diagnóstico y clasificación de la diabetes de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), con el objetivo de plantear una nueva clasificación, dejando de lado el criterio terapéutico y teniendo en cuenta la etiología de la enfermedad.

La clasificación previa agrupaba bajo el término diabetes, aquellas alteraciones que difieren en su patogénesis, evolución natural, respuesta terapéutica y prevención. A esto se agregan distintos factores genéticos y del medio ambiente que conducen a formas de diabetes que parecen fenotípicamente similares pero que pueden tener etiologías distintas. Se incluyen 4 categorías y un grupo adicional de individuos que tienen glucemias anormales con alto riesgo de desarrollar diabetes (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003), de forma que los principales tipos de diabetes serán los siguientes:

- **Diabetes Mellitus Tipo 1:**

La diabetes tipo 1 (también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia), se caracteriza por una destrucción de las células beta pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoacidosis y requiere la administración diaria de insulina. Se desconoce aún la causa de la diabetes tipo 1 y no se puede curar con el conocimiento actual. Se pueden distinguir 2 sub-grupos:

- *Autoimmune*: Esta forma de diabetes, previamente conocida por los términos diabetes dependiente de insulina, diabetes tipo 1 o diabetes juvenil, resulta de una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas (Atkinson y

Maclaren, 1994), provocando que la secreción de insulina termine siendo mínima o nula; se presenta en general durante la primera infancia y la adolescencia, aunque su aparición puede ocurrir a cualquier edad. La predisposición genética es múltiple y además se relaciona con factores ambientales aún no totalmente definidos.

- *Idiopática*: Se refiere a las formas de etiología desconocida de mínima prevalencia. Algunos de estos pacientes tienen insulinopenia permanente y son propensos a la cetoacidosis, pero no hay evidencia de autoinmunidad. La prevalencia de este tipo de paciente es muy baja, siendo la mayoría de origen africano o asiático. Esta forma de diabetes tiene una importante carga hereditaria y carece de evidencia inmunológica para la autoinmunidad de las células beta pancreáticas (Banerji y Lebovitz, 1989).
- **Diabetes Mellitus Tipo 2:**

La diabetes tipo 2 (también llamada no dependiente de la insulina o diabetes del adulto), es un término que se utiliza para las personas que tienen resistencia a la insulina y por lo general tienen una relativa deficiencia en la síntesis de insulina (Reaven et al., 1976; Olefsky et al., 1982; DeFronzo et al., 1979; Turner et al., 1979), representando aproximadamente un 90-95% de todos los pacientes diabéticos (American Diabetes Association, 2015). Al menos inicialmente y con frecuencia durante toda su vida, estos pacientes no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir. Probablemente hay numerosas causas de esta forma de diabetes y es probable que la proporción de pacientes en esta categoría disminuya en el futuro con la identificación de los procesos patogénicos específicos y defectos genéticos causantes.

Aunque no se conocen las causas específicas de la diabetes tipo 2, la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas no se produce. La mayoría de los pacientes son obesos, por lo que la obesidad en sí provoca un cierto grado de resistencia a la insulina (Kolterman et al., 1981; Bogardus et al., 1985) o bien

presentan una acumulación de grasa corporal en la región abdominal sin llegar a ser obesos (Kissebah y Peiris, 1989; Butkiewicz et al., 1995; Banerji et al., 1994; Umpierrez et al., 1995). Esta forma de diabetes cursa con frecuencia sin diagnosticar durante muchos años debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente, no presentando la suficiente gravedad en etapas anteriores como para que el paciente observe cualquiera de los síntomas clásicos de la diabetes (Harris; Zimmet, 1992; Fujimoto et al., 1987). Sin embargo, estos pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares (Fujimoto et al., 1987; Moss et al., 1994; Kuusisto et al., 1994; Andersson y Svärdsudd, 1995; Uusitupa et al., 1993). La secreción de insulina es defectuosa en estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina. Esta puede mejorar con la reducción del peso y/o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, pero rara vez podrá restaurarse la normalidad (Scarlett et al.; Firth et al., 1986; Simonson et al., 1984; Henry et al., 1986; Wing et al., 1994).

El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física (Zimmet, 1992); además con frecuencia se asocia con una fuerte predisposición genética, incluso en mayor magnitud que la forma autoinmune de la diabetes tipo 1 (Newman et al., 1987; Barnett et al., 1981). Sin embargo, la genética de esta forma de diabetes es compleja y no está definida totalmente.

- **Diabetes Mellitus Gestacional (DMG):**

Durante muchos años, la DMG se definió como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con el inicio o primer reconocimiento durante el embarazo (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003), independientemente de si la condición puede haber precedido al embarazo o comenzado de forma concomitante con este (Metzger, 1991). Esta definición facilitó una estrategia uniforme para la detección y clasificación de DMG, pero se

vio limitada por la imprecisión. Por ello, las mujeres con diabetes en el primer trimestre serán clasificados como diabetes tipo 2, mientras que se considera DMG aquella diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no es claramente diabetes manifiesta. En cualquier caso, unas 6 semanas o más después de que termine el embarazo, la diabetes de la mujer debe ser reclasificada de modo que podría diagnosticarse una glicemia alterada en ayunas (IFG) o intolerancia a la glucosa (IGT), las cuales no deben ser vistas como entidades clínicas, pero constituyen factores de riesgo para el desarrollo de la diabetes. En la mayoría de los casos de DMG, la regulación de la glucosa volverá a la normalidad después del parto.

- **Otros tipos Específicos:**

Según la ADA, en un pequeño porcentaje de los casos la diabetes puede ocurrir en personas con ciertos desórdenes o condiciones, como son los siguientes:

- *Alteraciones genéticas:* Varias formas de diabetes están asociados con defectos monogénicos en la función de las células beta pancreáticas (Vaxillaire y Froguel, 2008). Estas formas de diabetes se caracterizan frecuentemente por la aparición de hiperglucemia en una edad temprana y se caracterizan por la secreción de insulina alterada e incluyen la diabetes mellitus neonatal o diabetes monogénica de la primera infancia, la diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY), síndromes asociados con resistencia extrema a la insulina y otros síndromes poco frecuentes en los que la diabetes es una más de una pléyade de manifestaciones, como el síndrome de Wolcott-Rallison o el síndrome de Wolfram (Vaxillaire et al., 2009; Urano, 2016).
- *Endocrinopatías:* Varias hormonas (hormona del crecimiento, cortisol, glucagón o epinefrina) antagonizan con la acción de la insulina. Las cantidades excesivas de estas hormonas (acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma o feocromocitoma), pueden causar diabetes (Jadresic et al.,

1982; Stenström et al., 1988). Esto ocurre generalmente en individuos con defectos preexistentes en la secreción de insulina y la hiperglucemia se resuelve normalmente cuando se retira el exceso de la hormona.

- *Enfermedades pancreáticas*: Cualquier proceso adquirido que daña de forma difusa al páncreas puede causar diabetes como pueden ser la pancreatitis, trauma, infección, pancreatectomía y el carcinoma de páncreas (Cersosimo et al., 1991; Larsen et al., 1987).
- *Diabetes inducida por drogas o químicos*: Muchos medicamentos pueden afectar la secreción de insulina. Estos medicamentos no pueden causar la diabetes por sí mismos, pero pueden precipitar la aparición de diabetes en personas con resistencia a la insulina (Pandit et al., 1993; O'Byrne y Feely, 1990; Izzedine et al., 2005).
- *Infecciones*: Ciertos virus se han asociado con la destrucción de células beta pancreáticas. La diabetes se produce en pacientes con rubéola congénita (Forrest et al., 1971), aunque la mayoría de estos pacientes tienen antígenos leucocitarios humanos (HLA) y marcadores inmunológicos característicos de la diabetes tipo 1. Además, las infecciones ocasionadas por otros virus como son citomegalovirus, adenovirus, Cocksackie B y mixovirus han sido implicados en la inducción en ciertos casos de la enfermedad (King et al., 1983; Karjalainen et al., 1988; Pak et al., 1988) .

1.2.2. Prevalencia y diagnóstico

Los criterios diagnósticos para la diabetes se han modificado a partir de los previamente recomendados por el Comité de Expertos del NDDG (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003) o el grupo de estudio de la OMS (WHO Study Group, 1985). Las mismas pruebas se utilizan tanto para la predicción como el diagnóstico de la diabetes y puede ser identificada en cualquier lugar a lo largo del espectro de escenarios clínicos posibles, ya sea en individuos aparentemente en bajo

riesgo, en pacientes sintomáticos y en individuos de alto riesgo con sospechas de diabetes. Las mismas pruebas también pueden detectar individuos con prediabetes, un trastorno en que el nivel de la glucosa en la sangre es mayor de lo normal pero no lo suficientemente alto como para diagnosticar diabetes, pero significa que se encuentra en riesgo de desarrollarla. Existen varios métodos para diagnosticar la diabetes y cada uno debe ser confirmado posteriormente por cualquiera de los métodos dados, los cuales están resumidos en la siguiente **Tabla 1**:

Prueba	Descripción	Diabetes	Prediabetes
Hemoglobina glucosilada (A1C)	Promedio de glucosa en la sangre durante los últimos 2-3 meses	$\geq 6,5 \%$	5,7%–6,4 %.
Glucosa plasmática ayunas (PGA)	Nivel glucosa en sangre en ayuno	$\geq 126\text{mg/dl}$	100–125 mg/dl
Tolerancia glucosa oral (PTOG)	Nivel glucosa en sangre antes y después de la ingesta de una solución glucosada (75 gr)	$\geq 200 \text{ mg/dl}$	140–199 mg/dl
Prueba Aleatoria glucosa oral	Análisis de sangre en cualquier momento del día	$\geq 200 \text{ mg/dl}$	

TABLA 1. Criterios de diagnóstico y predicción de la diabetes.

En 2014 la OMS informa que la carga de morbilidad de la diabetes está aumentando en todo el mundo y en particular en los países en desarrollo. Las causas son complejas, pero en gran parte están relacionadas con el rápido aumento del sobrepeso, la obesidad y la inactividad física. La FID ha dado a conocer, durante la celebración del Congreso Mundial de la Diabetes en Vancouver, los datos de su Atlas de la Diabetes séptima edición (2015), que constituye la fuente acreditada de información sobre la prevalencia global y regional de la diabetes, así como del gasto y la mortalidad asociados. En este se registra que en el mundo hay más de 415 millones de personas con diabetes y para 2040 se prevé que esta cifra aumente a 642 millones, además se calcula que las muertes por diabetes aumentarán más de un 50% en los próximos 10 años tal y como se refleja en la **Figura 1**. Actualmente, la diabetes se ha convertido en una de las causas

principales de enfermedad y muerte prematura en la mayoría de los países, sobre todo debido al aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares (50%-80% de las muertes de pacientes diabéticos se deben a causas cardiovasculares) y se prevé que la diabetes se convierta en el año 2030 en la séptima causa mundial de muerte. Además, la diabetes es una causa importante de ceguera, amputación e insuficiencia renal.

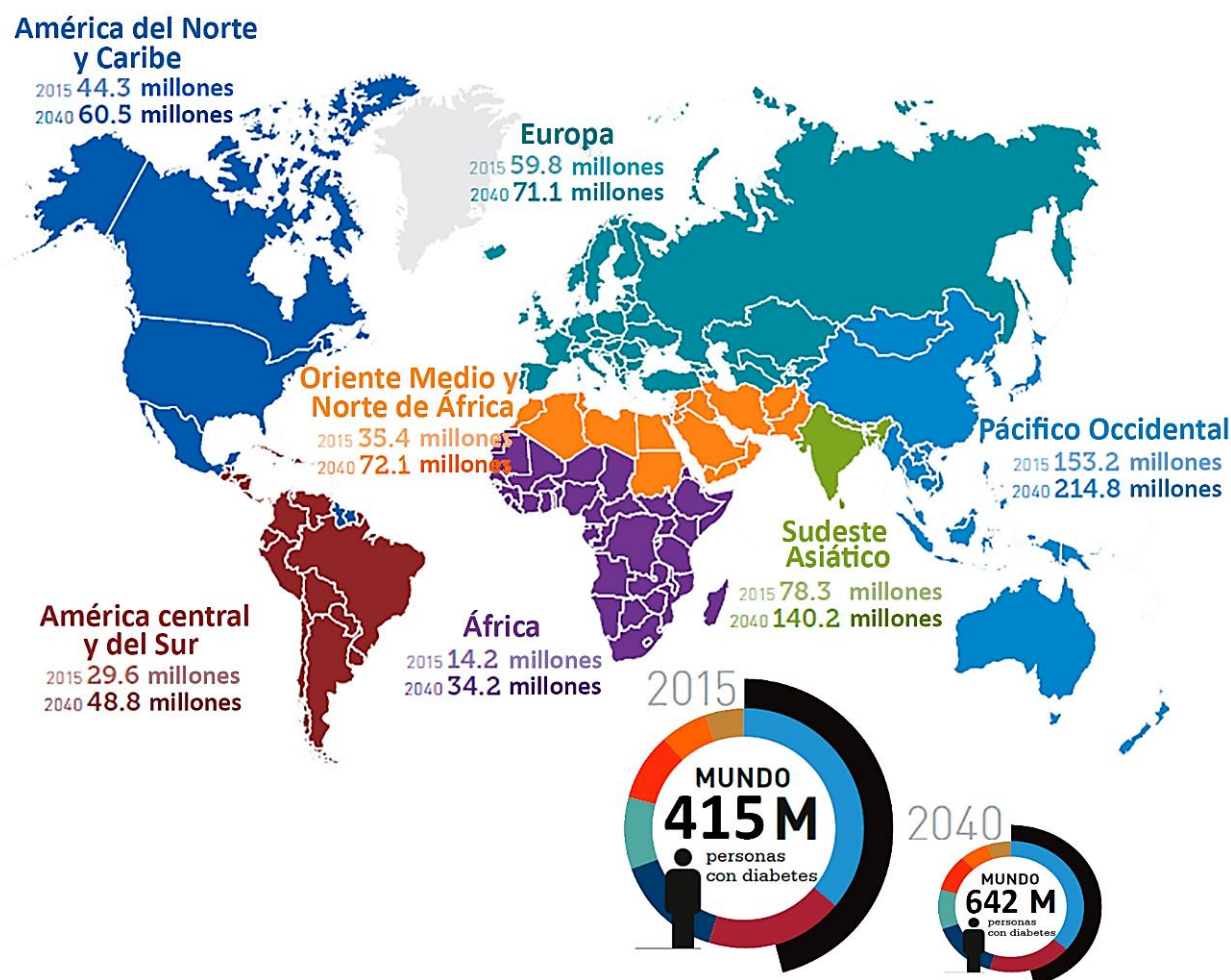


FIGURA 1. Representación de la distribución geográfica de personas afectadas por diabetes, indicando el número de personas con diabetes a nivel mundial por región en 2015 y la estimación en 2040. Imagen modificada del Atlas de Diabetes de la FID. Séptima edición, 2015.

El estudio di@bet.es realizado desde el CIBERDEM del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación) en colaboración con la SED y la FED (Soriguer et al., 2012), situó la prevalencia de la diabetes en España en torno al 13,8% de la población, un porcentaje ligeramente superior a los estudios realizados anteriormente en España. La diabetes se ha convertido en uno de los problemas sanitarios más graves de nuestro

tiempo, los resultados del estudio también confirman la asociación entre diabetes, obesidad e hipertensión arterial y la importancia de la actividad física como método de prevención.

1.2.3. Tratamiento de la diabetes

La era de la insulinoterapia o terapia insulínica de la diabetes se inició en 1922, cuando los profesores Frederick Grant Banting, Charles Herbert Best, Jon James Richard Macleod y Jame Bertram Collip, trabajando en la universidad de Toronto, fueron capaces de aislar y purificar la insulina (Rosenfeld, 2002; Maclean, 1926), lo cual proporcionó a la ciencia médica uno de los más importantes medios de prolongar la vida humana y constituyó un hito en la historia del tratamiento de la fatal enfermedad. Por primera vez en la historia, el tratamiento impidió la cetoacidosis y muerte permitiendo a los pacientes con diabetes vivir durante décadas con la enfermedad. La capacidad de esta terapia de prevenir la muerte y proporcionar una vida casi normal a los pacientes parecía milagrosa y los muchos problemas asociadas al tratamiento insulínico eran preferibles a la alternativa de una muerte segura. Sin embargo, el conocimiento de estas complicaciones trajo consigo la necesidad de una terapia más sofisticada.

Desde entonces, las preparaciones de insulina y las estrategias terapéuticas han ido desarrollándose inicialmente a expensas del origen de la insulina y posteriormente con la incorporación de sustancias que modificaban su absorción. Ya en la década de los 90 surgieron entonces los análogos de la insulina, con una especial capacidad de cambio en su farmacocinética. Más adelante se introdujeron nuevas formas de liberación a la insulina inyectable con jeringuilla o pluma, como son las bombas de infusión continua y la insulina inhalada, todo esto apoyado por nuevos sistemas de monitorización de la glucosa. En la última década, el trasplante de islotes pancreáticos y la terapia celular con la obtención de células productoras de insulina a partir de células troncales pluripotentes aumentan las expectativas, en la **Tabla 2** se resumen los principales

avances en este campo. Todos estos elementos confirman el interminable camino en la búsqueda de terapias eficaces en el tratamiento de la diabetes, que podemos clasificar en los siguientes tipos:

- **Terapia insulínica y farmacológica:** La terapia insulínica o insulino terapia se refiere al tratamiento mediante la administración de insulina biosintética exógena que se obtiene mediante técnicas de recombinación genética a partir de cultivos de bacterias o levaduras y cuyo objetivo esencial será prevenir o retrasar las complicaciones micro y macrovasculares asociadas a la diabetes. Los pacientes con diabetes tipo 1 dependen de la insulina exógena para su supervivencia y el manejo terapéutico actualmente se basa en un tratamiento convencional o intensivo (Simó y Hernández, 2002), según el seguimiento que se haga de la enfermedad. La insulina se puede administrar por vía subcutánea mediante jeringuillas, plumas o bombas de infusión. A diferencia de lo que ocurre en la diabetes tipo 1, que se basa universalmente en la combinación del tratamiento con insulina, dieta y ejercicio físico, el tratamiento de la diabetes tipo 2 es muy variable en función de las características del paciente y del estadio evolutivo de la enfermedad. Los fármacos indicados en un paciente afecto de diabetes tipo 2 variarán desde la abstención de los mismos (tratamiento únicamente dietético y ejercicio físico), a la utilización de los diferentes tipos de fármacos orales o bien la administración de insulina, todos ellos solos o en diferentes combinaciones.
- **Trasplante de páncreas:** El primer trasplante de páncreas fue realizado en la Universidad de Minnesota por William Kelly y Richard Lillehei en 1966 (Kelly et al., 1967), para tratar la diabetes tipo 1 en una mujer con insuficiencia renal terminal a la que se le trasplantó conjuntamente páncreas y riñón. El trasplante de páncreas tiene por finalidad mejorar la calidad de vida por encima de la conseguida con la insulino terapia, de forma que el objetivo será establecer un estado de normoglucemia sin aporte exógeno de insulina, así como prevenir,

interrumpir o revertir el desarrollo de las complicaciones secundarias de la diabetes, aunque más controvertido es su efecto sobre la evolución de dichas complicaciones. La necesidad de inmunosupresión hace que el trasplante de páncreas deba restringirse a los pacientes en los que las complicaciones de la diabetes son o pueden llegar a ser, más severas que los potenciales efectos indeseables de la medicación anti-rechazo. Otra complicación en los trasplantes de páncreas es que se coloca un órgano con múltiples funciones entre las que sólo interesa la función secretora de insulina, de modo que el resto de las funciones digestivas no interesan y en ocasiones pueden producir problemas.

- **Terapia Celular:** Se trata de un procedimiento para sustituir o reparar la función de células o tejidos lesionados y consiste en trasplantar células individuales a un órgano receptor en cantidades suficientes para que sobrevivan y restauren la función normal. En el caso de la diabetes se lleva a cabo el trasplante de células productoras de insulina, que pueden ser obtenidas a partir de las siguientes fuentes celulares:
 - **Islotes pancreáticos:** La primera alternativa al trasplante de páncreas para curar la diabetes fue el trasplante de islotes pancreáticos que comienza a plantearse con vagos intentos sin gran éxito a finales del siglo XIX. No será hasta 1967 cuando se da el primer paso relevante a manos de Paul Lacy (Lacy y Kostianovsky, 1967), quien mediante el método de digestión pancreática con colagenasa, logra el aislamiento y posterior trasplante de un número suficiente de islotes pancreáticos en modelos animales diabéticos (Kemp et al., 1973; Scharp et al., 1975). Posteriormente, en 1988 Camillo Ricordi (Ricordi et al., 1988) introdujo un método semiautomatizado de aislamiento de islotes pancreáticos, facilitando la obtención de cantidades más adecuadas de los mismos. Estos avances permitieron en 1990 lograr por primera vez que un paciente con diabetes tipo 1 pudiera suspender el tratamiento con insulina y mantener una normoglicemia tras el trasplante.

Sin embargo, la emoción del momento se vio frenada por la pronta reaparición de hiperglucemia en los pocos casos de trasplante exitoso. Esta situación se vio modificada radicalmente a finales del siglo XX, cuando utilizando un método de purificación de islotes pancreáticos mejorado por Lakey (Lakey et al., 1997) y gracias al conocimiento previo de todos los avances realizados hasta la fecha, se desarrolló en el año 2000 el Protocolo de Edmonton (Shapiro et al., 2000). Un protocolo llevado a cabo en 7 pacientes diabéticos en los que se consiguió restablecer la independencia a insulina después de recibir islotes pancreáticos de varios donantes. Aunque los primeros resultados del Protocolo de Edmonton fueron muy alentadores, más tarde se vio que con las técnicas quirúrgicas actuales no se puede aislar y purificar un número significativo de material obtenido de pacientes vivos, por lo que los donantes debían ser cadáveres. Además, durante la preparación de las células a partir de los páncreas donantes se pierde mucha cantidad de material por lo que para trasplantar a un paciente receptor con un mínimo de islotes pancreáticos se requerían al menos 2 páncreas donantes. Por tanto, el trasplante de islotes pancreáticos resultó ser mucho más complejo y menos efectivo de lo esperado inicialmente, además de que vuelve a ser necesario el uso de medicamentos inmunosupresores o contra el rechazo al trasplante para mantener la función de los islotes pancreáticos trasplantados, por lo que tampoco solucionaban este problema.

- **Células troncales pluripotentes:** La escasez de órganos por un lado y el hecho de que cada implante de islotes pancreáticos de otro páncreas aumenta las posibilidades de rechazo inmunológico, hace que este tratamiento se vea limitado a centros de alta experiencia y pacientes muy seleccionados. Asimismo, las drogas inmunosupresoras que deben administrarse pueden producir efectos no deseados en el organismo. Por consiguiente, hasta el momento el trasplante de páncreas o islotes

pancreáticos no han dado una solución definitiva para el tratamiento de la diabetes. Como resultado de una enorme e incansable investigación científica en todo el mundo, el esfuerzo de numerosos especialistas de la materia y el empeño de gobiernos y autoridades de la salud, se están desarrollando una amplia variedad de alternativas terapéuticas para suplir los inconvenientes del tratamiento insulínico y el trasplante de páncreas o islotes pancreáticos. En este sentido, las células troncales tienen gran potencial como base para la terapia celular de enfermedades degenerativas, incluyendo la diabetes ya que pueden constituir una fuente alternativa de células productoras de insulina. Los primeros estudios se llevaron a cabo con trasplantes de células troncales en humanos mediante infusión intravenosa sin diferenciación previa *in vitro*. Uno de estos estudios, se realizó mediante el trasplante autólogo de células provenientes de la médula ósea. Se seleccionaron pacientes con menos de 8 semanas desde el diagnóstico de la diabetes y se les administró, además, una terapia de inmunosupresión a altas dosis previamente a la infusión de las células (Couri y Voltarelli, 2008). Otro estudio utilizó células troncales procedentes del cordón umbilical seleccionando pacientes que hubiesen preservado la sangre de su cordón. En este trabajo, se trasplantaron niños de entre 3 a 7 años con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico (Haller et al., 2009). Ninguno de estos estudios pudo demostrar que las células troncales logren suprimir totalmente el uso de insulina exógena, aunque se observó en algunos casos una disminución de la dosis diaria de insulina. Por lo que, la producción a gran escala de células productoras de insulina a partir de células troncales es una prometedora alternativa. Durante la última década, varios grupos han contribuido a generar protocolos de diferenciación que simulan el desarrollo del páncreas. Las células troncales poseen un potencial notable para la autorrenovación y capacidad de

diferenciarse en cualquier célula del cuerpo humano cuando se expone a las señales apropiadas de desarrollo (Thomson et al., 1998). Estas células por tanto, constituyen una prometedora fuente ilimitada de células diferenciadas para aplicaciones en modelo de enfermedades, screening de fármacos y terapia celular para las enfermedades degenerativas como la diabetes (Hmadcha et al., 2009; Berná et al., 2001; Soria et al., 2008; Roche et al., 2006).

Cronología en los avances del tratamiento de la diabetes	
1889	Oskar Minkowski descubre la relación entre la diabetes y el páncreas. ^(Von Mering y Minkowski, 1889)
1893	Primer intento fallido de trasplante de páncreas por Minkowski. ^(Minkowski, 1893)
1963	Se aisló por primera vez la insulina humana cristalizada del páncreas de un cadáver. ^(Mirsky et al., 1963)
1965	H. Zahn y Meienhofer sintetizaron la insulina humana. ^(Zahn et al., 1965)
1966	Primer trasplante exitoso de páncreas en un ser humano. ^(Kelly et al., 1967)
1970	John Pickup comenzó a usar la infusión de insulina continua subcutánea. ^(Pickup et al., 1978)
1972	Se inician los experimentos con trasplantes de islotes pancreáticos. ^(Kemp et al., 1973; Scharp et al., 1975)
1980	Insulina humana recombinante se utilizó por primera vez en ensayos clínicos. ^(Keen et al., 1980)
1990	Primer trasplante de islotes pancreáticos sin revertir la independencia a la insulina. ^(Tzakis et al., 1990)
2000	El Protocolo Edmonton logra trasplantes exitosos de islotes pancreáticos. ^(Shapiro et al., 2000)
2014	Generación de células productoras de insulina a partir de CTEs humanas <i>in vitro</i> para trasplante en pacientes (ViaCyte). ^(Bruin et al., 2013)

TABLA 2. Descripción cronológica de los principales avances en el tratamiento terapéutico de la diabetes.

1.3. El Páncreas

El páncreas es un órgano mixto que se localiza en la cavidad abdominal detrás del estómago y desempeña un papel esencial en el sistema digestivo y endocrino. Para entender la complejidad en la obtención de células productoras de insulina a partir de las CTEs en el laboratorio, debemos conocer en primer lugar la estructura anatómica básica del páncreas, que como se puede observar en la **Figura 2**, está compuesto por

distintos tipos de tejido (endocrino y exocrino), que se agrupan formando lóbulos macroscópicamente visibles y separados entre sí por septos de tejido conjuntivo que contienen vasos sanguíneos, linfáticos y nervios.

En humanos, el páncreas es una glándula que se ubica en el abdomen adyacente al duodeno y rodeada por el estómago, el intestino delgado, el hígado, el bazo y la vesícula biliar. Aproximadamente un 80-85% del volumen pancreático está compuesto por la porción principal de tejido que es de naturaleza exocrina, un 10-15% corresponde a la matriz extracelular y los vasos, mientras que la porción endocrina constituye alrededor del 2% (Klein et al., 1996). Las células exocrinas del páncreas producen enzimas que ayudan a la digestión, mientras que las células endocrinas se encargan de producir hormonas o sustancias que circulan por el torrente sanguíneo para ejercer su acción en otra parte distinta del organismo:

- **Páncreas exocrino:** La mayor parte del páncreas está compuesto por los acinos y el sistema ductal asociado. Las células acinares que producen enzimas digestivas, están dispuestas en racimo de uvas llamados acinos, localizándose en los extremos más pequeño del sistema de conductos de ramificación. Los conductos, los cuales añaden mucosa y bicarbonato a la mezcla de enzimas, forman una red de tamaño creciente, culminando en los conductos pancreáticos principales y accesorios que desembocan en el duodeno.
- **Páncreas endocrino:** Integrados dentro del tejido acinar se localizan los islotes pancreáticos constituidos por diferentes tipos celulares, su función es secretar hormonas al torrente sanguíneo necesarias para el metabolismo de los nutrientes y mantener los niveles adecuados de glucosa que es la fuente de energía principal de nuestro organismo.

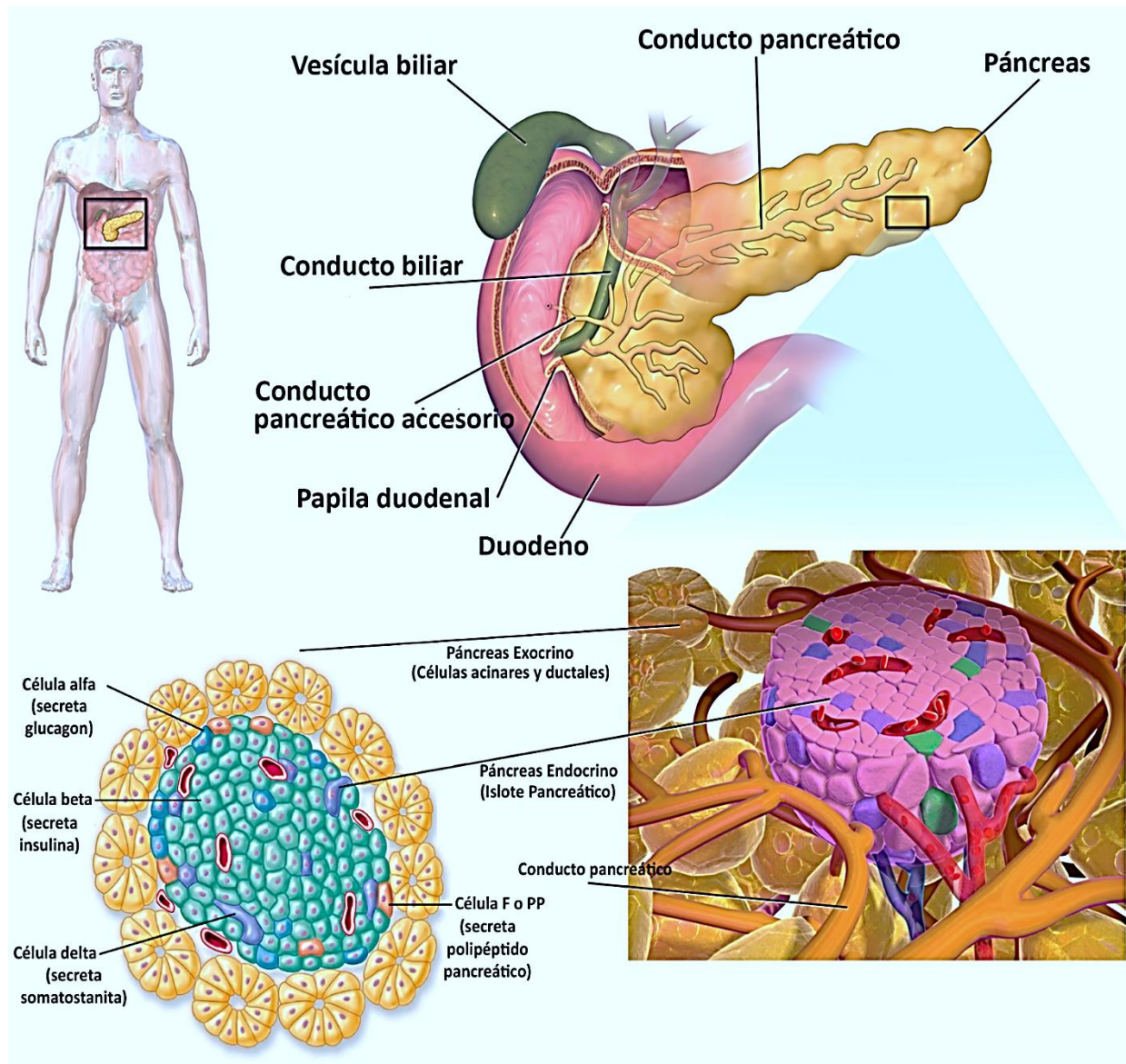


FIGURA 2. Una sección transversal del páncreas muestra los islotes de Langerhans, que es la unidad funcional del páncreas endocrino, constituido por diferentes grupos celulares como son las células beta pancreáticas, sintetizan y secretan insulina; células alfa, secretan glucagón, que aumenta la concentración de azúcar en la sangre; células delta, secretan la hormona inhibidora del crecimiento somatostatina, que inhibe la secreción de la insulina y el glucagón; células epsilon, secretan grelina y células PP, secretan el polipéptido pancreático, el cual influye en la secreción de enzimas intestinales y gástricas, inhibe los movimientos en el intestino y actúa como neurotransmisor.

1.3.1. Desarrollo endodérmico: Origen del páncreas

Una de las primeras decisiones en el destino celular realizada durante la embriogénesis de vertebrados es la separación de las 3 capas germinales clásicas: ectodermo, mesodermo y endodermo. El endodermo, el cual primero forma la parte externa del

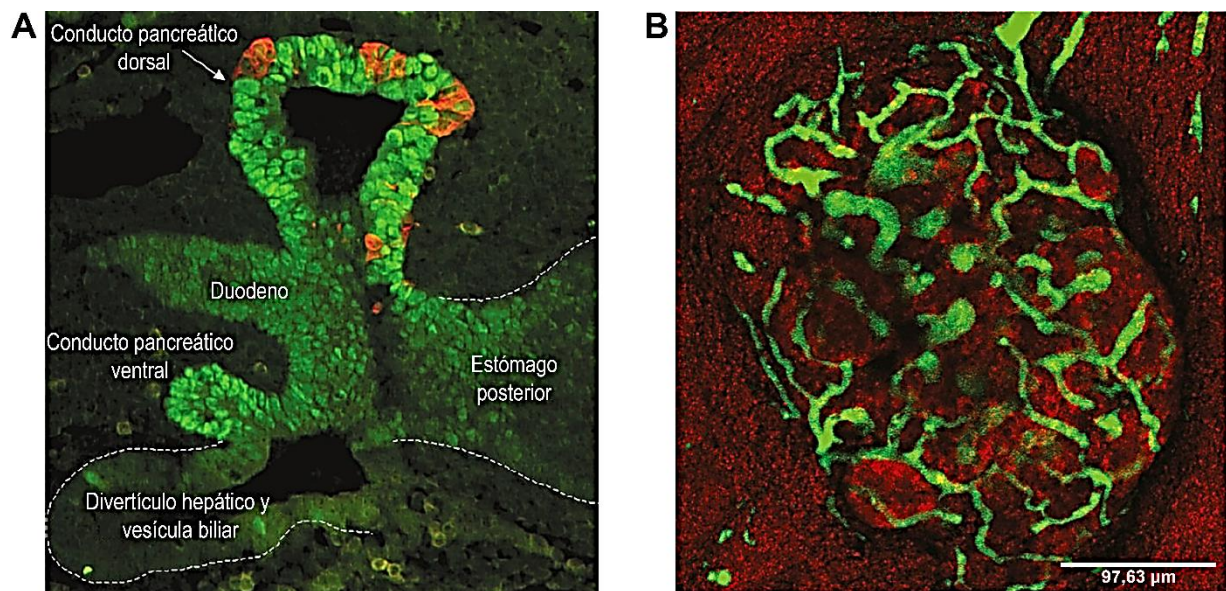
embrión para más tarde internalizarse, dará lugar al sistema respiratorio y digestivo, y sus órganos asociados, como son el hígado, páncreas, pulmones, intestino o estómago.

Al endodermo embrionario se le atribuyen 2 funciones principales; la primera función es inducir la formación de varios órganos mesodérmicos como son el corazón, los vasos sanguíneos e incluso la capa germinativa mesodérmica; la segunda función del endodermo embrionario es construir el revestimiento de 2 tubos en el interior del cuerpo de los vertebrados, uno de ellos se forma como una evaginación del tubo digestivo que finalmente se bifurca, originando los pulmones y el otro que se extiende a lo largo de la longitud corporal origina el tubo digestivo y formará a partir de sus esbozos el hígado, vesícula biliar, páncreas y órganos accesorios que se desarrollan inmediatamente caudal al estómago.

El páncreas se desarrolla a partir de la fusión de los primordios dorsal y ventral endodérmicos procedentes de la parte caudal del intestino anterior, los cuales se aproximan al crecer y finalmente se fusionan durante la rotación del estómago e intestino. El brote endodérmico dorsal formará la mayor parte del páncreas (cabeza, cuerpo y cola) y el brote ventral desarrollará la apófisis uncinada y parte duodenal de la cabeza del páncreas (Mastsumara y England, 1996).

La formación del páncreas puede ser la otra cara de la formación del hígado, de forma que mientras las células del corazón promueven y la notocorda impide la formación del hígado, la notocorda puede promover activamente la formación del páncreas y el corazón bloquearla. Durante la formación del endodermo se ha postulado la hipótesis de que la expresión de *PDX1* le otorga a una región particular del tubo digestivo la capacidad para llegar a ser páncreas o hígado (Song et al., 1999) como se observa en la **Figura 3A**. Por tanto, un grupo de condiciones como son la presencia de notocorda y ausencia de corazón, lleva a la formación de páncreas (Kim et al., 1997). La notocorda activa el desarrollo del páncreas al reprimir la expresión de la vía de señalización Sonic hedgehog (Shh) en el endodermo (Hebrok et al., 1998), el cual es expresado en todo el

endodermo del tubo digestivo, excepto en la región que formará el páncreas. La notocorda en esta región del embrión secreta activina y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), que son capaces de regular la expresión de la vía de señalización Shh en el endodermo. El desarrollo pancreático es iniciado en aquellas localizaciones donde el endodermo del intestino anterior contacta al endotelio de los vasos sanguíneos principales. Por tanto, la asociación de tejidos pancreáticos con vasos sanguíneos es crítica en la formación de células endocrinas y exocrinas del páncreas como observamos en la siguiente **Figura 3B**.



1.3.2. Patrones de expresión génica que regulan el desarrollo del páncreas

Los factores de transcripción constituyen una clase de proteínas capaces de regular la expresión de numerosos genes, para ejecutar un determinado programa celular.

Múltiples factores de transcripción intervienen en el desarrollo pancreático y constituyen una compleja e intrincada red reguladora que han sido resumidos en la **Figura 4A**. Una vez se ha establecido el endodermo, varios factores de transcripción son esenciales para el establecimiento y proliferación de las células progenitoras pancreáticas que incluye varios genes tipo *HNF* como son *HNF1β* (*TCF2*), *HNF1α* (*TCF1*), *HNF4*, *HNF6* (*OC-2*) o *HNF3β* (*FOXA2*) (Bort et al., 2004; Grapin-Botton et al., 2001; Jacquemin et al., 2003; Haumaitre et al., 2005; Dufort et al., 1998; Poll et al., 2006; Yang et al., 2016), este último es un gen regulador clave en el desarrollo endodérmico y participa en la expresión génica específica en pulmón, hígado y páncreas adultos (Gao et al., 2008; Lee et al., 2002). Estos factores parece que cooperan con un regulador clave del desarrollo pancreático como es *PDX1*, requerido para la formación del páncreas, su expresión comienza en células epiteliales de la región dorsal y ventral pancreática, presentando una clara heterogeneidad de forma que reduce su expresión gradualmente con la diferenciación exocrina y está implicado en varios aspectos de la función de células beta pancreáticas adultas (Jennings et al., 2013; Sherwood et al., 2009; Fujitani et al., 2006; Offield et al., 1996). Durante el desarrollo pancreático *PDX1* provoca la formación del esbozo desde el epitelio del tubo digestivo; reprime la expresión de genes que son característicos de otras regiones del tubo digestivo (Teo et al., 2015); mantiene la represión de la vía de señalización Shh; inicia aunque no completa la diferenciación celular de los islotes pancreáticos y es necesario para la expresión de la insulina (Grapin-Botton et al., 2001). En los embriones humanos, la robusta detección de *PDX1* fue acompañada inicialmente por una débil expresión de *SOX9* en el endodermo pancreático, necesario para el mantenimiento de poblaciones progenitoras multipotentes (Pan y Wright, 2011; Cano et al., 2014; Jennings et al., 2013), que también expresan *SOX17* necesario para la formación del endodermo (Spence et al., 2009) y factores Gata (*GATA4* y *GATA6*) requeridos al menos parcialmente para una apropiada expresión de *PDX1* (Carrasco et al., 2012; Cano et al., 2014).

La determinación pancreática no es un estado permanente, tendrá lugar una especificación de compartimentos más especializados del endodermo donde las células adquieren su destino terminal especializado con el tiempo y su especialización implica una mayor participación de reguladores intrínsecos de la célula. Las primeras células endocrinas que aparecen en el páncreas son las células beta, seguidas del resto de tipos celulares de los islotes pancreáticos (Piper et al., 2004; Lyttle et al., 2008; Riedel et al., 2012; Jennings et al., 2013). Coincidente con la pérdida de *SOX9*, el compromiso endocrino en las células epiteliales pancreáticas se inicia con la expresión de *NEUROG3* (Gradwohl et al., 2000; Lyttle et al., 2008; Jennings et al., 2013), que precede a la inducción de los factores de transcripción *ISL1*, *NEUROD1*, *MAFA/B*, *NKX2.2*, *NKX6.1* y *PAX6* implicados en la maduración celular endocrina (Jeon et al., 2009). Con el uso de un sistema inducible Cre-Lox para marcar las células de la progenie que expresan *NEUROG3* o *PDX1* (Gu et al., 2002), se demostró que las células que están expresando *NEUROG3* son específicamente progenitoras de células de los islotes pancreáticos, mientras que las células que están expresando *PDX1* dan origen a los 3 tipos de tejido pancreático (exocrino, endocrino y células ductales). Los factores de transcripción *NKX6.1* y *NKX2.2* constituyen marcadores tempranos del epitelio pancreático. En los islotes pancreáticos maduros, la expresión de *NKX6.1* está restringida a las células beta pancreáticas (Jensen et al., 1996), donde se ha sugerido que actúa como un represor transcripcional del glucagón (Gauthier et al., 2007; Schisler et al., 2005), mientras que *NKX2.2* es un marcador de células alfa, beta y F o PP (Sussel et al., 1998). El factor *ISL1* parece ser necesario para el desarrollo de páncreas en humanos y ratones (Du et al., 2009; May). En todos los tipos de células endocrinas de los islotes pancreáticos adultos se encuentra la expresión de *NEUROD1* (Jeon et al., 2009; Jennings et al., 2013) y resulta esencial para la maduración de células beta pancreáticas (Gu et al., 2010). Otro factor como *PAX6* comienza a expresarse durante el desarrollo pancreático y se mantendrá en las células de islotes pancreáticos adultos (Lyttle et al., 2008) y parece intervenir en la diferenciación y asignación de células endocrinas (Sander et al., 1997; Ahlqvist et al.,

2012). Por último, *MAFA* tiene una expresión relativamente tardía en el desarrollo (Dai et al., 2012), asociándose como un marcador de maduración crucial para la respuesta de células beta pancreáticas a la glucosa a través de la regulación de *INS* y *GLUT2* (Hang y Stein, 2011).

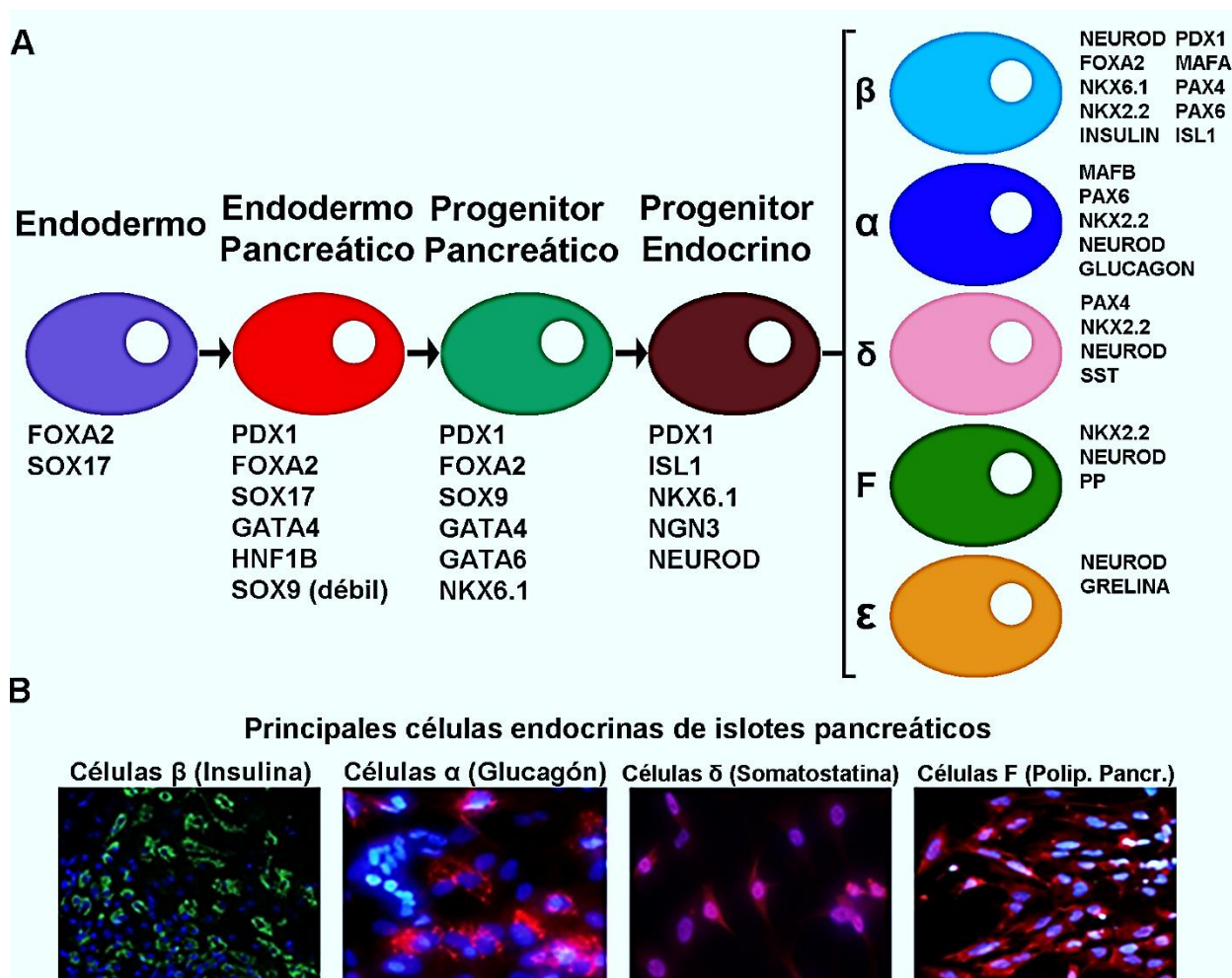


FIGURA 4. A) esquema de los factores de transcripción que definen los diferentes tipos celulares y estadios de diferenciación durante el desarrollo pancreático. B) Imágenes de fluorescencia representativas de las principales células endocrinas (células-β, células-α, células-δ y células-F o PP) de los islotes pancreáticos, con los núcleos identificados con DAPI.

Las fases de desarrollo pancreático incluye la determinación de los dominios pancreáticos en el intestino anterior ventral y dorsal, la formación de los conductos y el crecimiento, seguido por la diferenciación de los linajes pancreáticos, donde la combinación de un conjunto de factores es determinante en la especificación del tejido y los diferentes tipos celulares (**Figura 4B**), y no la simple acción de un regulador máster

altamente específico. La identificación de todos estos factores y determinar los tiempos adecuados de expresión, es clave para un mejor conocimiento del desarrollo pancreático que nos permitirá mejorar los procesos de obtención de células beta pancreáticas terapéuticas que puedan ser trasplantadas en pacientes diabéticos.

1.4. Células troncales

1.4.1. ¿Qué es una célula troncal?

La biología de las células troncales es una de las áreas más importantes en la investigación biomédica actual. El primer concepto de terapia celular y medicina regenerativa surge ya en 1959, cuando el Profesor E. Donnall Thomas realiza el primer trasplante de médula ósea con éxito y es premiado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina. En aquellos años, nadie hablaba de células troncales y el Profesor E. Donnall Thomas solamente explicaba que tenía que haber algún tipo celular responsable de la regeneración hematopoyética en los pacientes afectados con leucemia que recibían dicho trasplante de médula ósea (Thomas et al., 1959). Además, la embriología y zoología ya había demostrado con anterioridad, si bien en especies inferiores como la salamandra o el ajolote, la existencia de una regeneración tisular.

Según la definición aportada por Weissman en 2002 (Weissman, 2002) podemos definir a las células troncales como aquellas células que tienen la capacidad, no sólo de poder cultivarse y reproducirse a sí mismas, sino también de generar células adultas de diferente progenie, es decir de diferentes tejidos. Las células troncales se definen de manera puramente funcional como unidades biológicas capaces de auto-renovarse de forma prolongada y de generar diferenciación a múltiples estirpes celulares (Weissman, 2000). Por tanto, una célula troncal es aquella capaz de realizar divisiones asimétricas, a diferencia del resto de las células de un organismo que lo hacen exclusivamente de forma simétrica (autorrenovación). El poder realizar divisiones asimétricas, permite mantener un número más o menos constante de estas poblaciones de células troncales

durante toda la vida del organismo e ir generando otras células “hijas” que son las responsables de construir y mantener las estructuras funcionales (Knoblich, 2008). Además, una célula troncal debe poseer una capacidad de multiplicación alta y potencial para generar varios linajes celulares (pluripotencia), la plasticidad o potencialidad de las células troncales es una característica que indica la variedad de tipos celulares que pueden generar. Parece cada vez más claro que alteraciones de este mecanismo básico de autorrenovación se encuentran implicadas tanto en fenómenos genuinamente fisiológicos como en el envejecimiento, cáncer y en muy diversas patologías humanas.

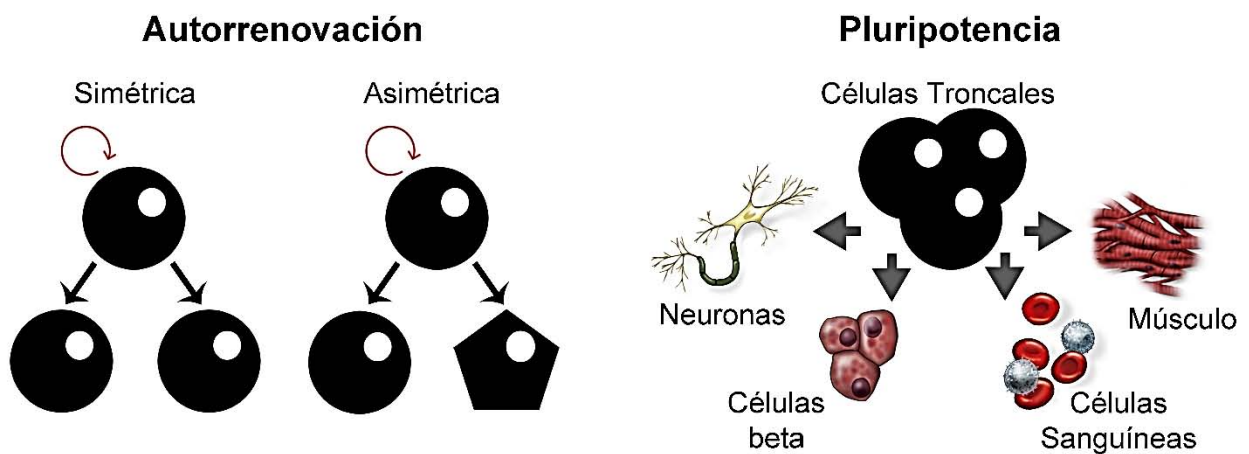


FIGURA 5. Propiedades principales de las células troncales (autorrenovación y pluripotencia), representando la capacidad de las células para llevar a cabo un tipo de división asimétrica, que permite la transición hacia distintos tipos de células especializadas en un tejido concreto, mientras que se mantiene la población de células troncales al originarse también una célula idéntica a la progenitora.

1.4.2. Clasificación de las células troncales

Existen 2 grandes formas de clasificar las células troncales, en función de su potencialidad o de su origen como se representa en la **Figura 6**. La clasificación más común de las células troncales se fundamenta en la potencialidad que tienen para originar células de diferentes estirpes, lo cual está relacionado con el grado de diferenciación de las células troncales. Por tanto, a grandes rasgos y de manera relativa podemos definir diferentes tipos de células troncales en base a su descendente capacidad de regeneración:

- **Células troncales totipotentes:** células capaces de crecer y formar un organismo completo. La célula troncal totipotente por excelencia es el cigoto, formado tras la fecundación de un óvulo por un espermatozoide.
- **Células troncales pluripotentes:** células capaces de formar todas las células de los tejidos embrionarios, aunque no son capaces de originar un individuo completo. En las primeras etapas del desarrollo embrionario se forma el blastocito, formado por una gran cavidad interior y 2 tipos celulares como son la capa externa que dará lugar la placenta y las envolturas embrionarias (trofoblasto) y la masa celular interna (MCI) que formará todos los tejidos del organismo. Las células de la MCI del blastocisto son células pluripotentes, es decir que no pueden formar un organismo completo, pero puede formar cualquier tipo de célula proveniente de las 3 capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como del linaje germinal y/o saco vitelino.
- **Células troncales multipotentes:** células más diferenciadas que sólo pueden dar tipos celulares de su propia capa o linaje embrionario de origen. Una vez desarrolladas se auto-renuevan durante toda la vida del individuo, a diferencia de las células troncales totipotentes y pluripotentes, que solo se encuentran durante la etapa embrionaria.
- **Células troncales unipotentes o específicas de tejido:** células que sufren una restricción en la expresión de su genoma, desarrollando un mayor grado de diferenciación y producen tipos celulares característicos del tejido en el cual se encuentran.

Desde un punto de vista ontogénico, las células troncales pueden obtenerse de diferentes tejidos, entre los que podemos destacar los siguientes:

- **Células troncales embrionarias (CTEs):** Las CTEs sólo existen en las primeras fases del desarrollo embrionario y son capaces de producir cualquier tipo de célula en el cuerpo. Bajo las condiciones adecuadas, estas células conservan la capacidad

de dividirse y hacer copias de sí mismas indefinidamente. Los científicos están empezando a comprender cómo hacer que estas células se conviertan en cualquiera de los más de 200 tipos de células del cuerpo humano. Conforme avanza el desarrollo embrionario se forman diferentes poblaciones de células troncales con potencialidad para generar tejidos cada vez más restringida y que en la edad adulta se encuentran en "nichos" en algunos tejidos del organismo.

- **Células troncales adultas (CTAs):** Las CTAs, no son exclusivas del embrión en desarrollo, sino que están presentes también en el tejido adulto, donde son importantes en la homeostasis del organismo. Las CTAs son más limitadas y especializadas que las CTEs, ya que pueden dar origen solo a las células propias de cada tejido u órgano (células troncales unipotenciales) o ser capaces de originar unos pocos tipos celulares (células troncales multipotenciales). Las células troncales adultas también tienen una capacidad más limitada para reemplazarse que las células troncales embrionarias.

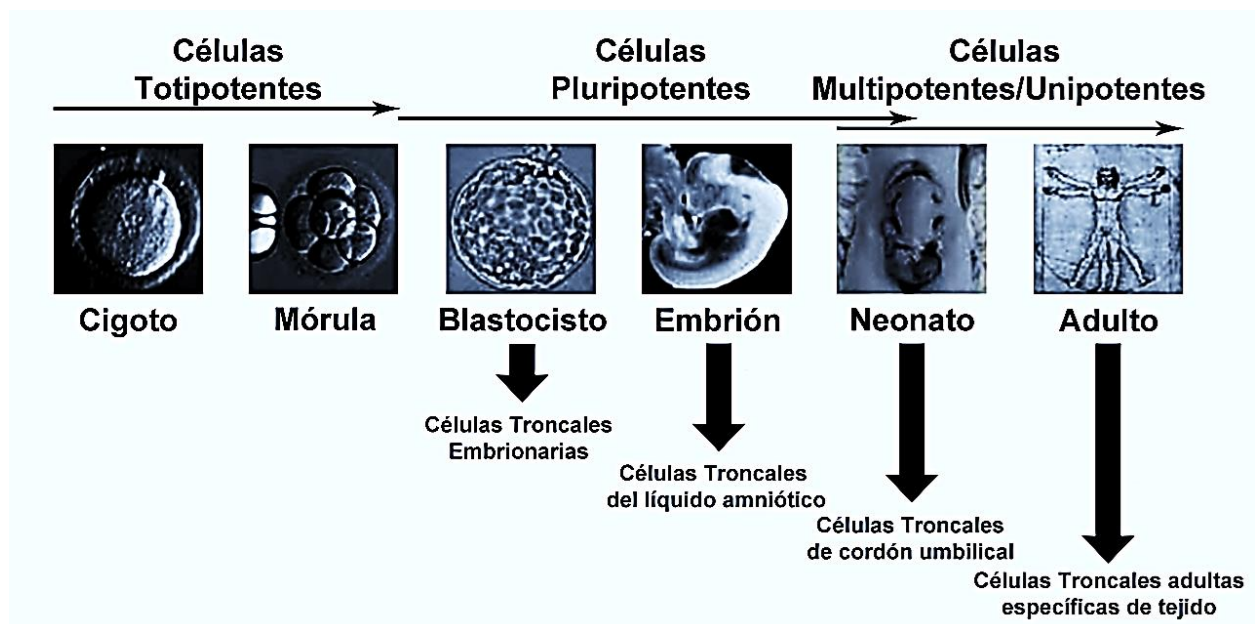


FIGURA 6. Representación esquemática de los tipos de células troncales, que en función del origen presentarán una potencialidad con diferente limitación.

Las CTEs y CTAs presentan sus ventajas y desventajas con respecto a su potencial aplicación en la terapia celular. Una de las principales diferencias entre ambas es su

diferente capacidad en el número y tipo de células en las que pueden llegar a convertirse (diferenciación). Las CTEs pueden originar cualquiera de los tipos celulares del organismo ya que son pluripotentes, mientras que las CTAs tienen un potencial más limitado. Por otro lado, las CTEs pueden ser obtenidas y crecidas relativamente fácil en cultivo en estado no diferenciado durante periodos prolongados sin perder su capacidad para diferenciarse, mientras que las CTAs son escasas en los tejidos maduros, por lo que el aislamiento de estas células de un tejido adulto constituye un reto y los métodos para ampliar su número en cultivo celular y mantener en estado no diferenciado aún no se han resuelto eficientemente (Hmadcha et al., 2009). Esto constituye una importante distinción, ya que se necesitan grandes cantidades de células con un amplio potencial para las terapias de reemplazo de células troncales. Por todo ello, numerosos estudios se enfocan en la utilización de las CTEs, cuyas características serán detalladas en profundidad a continuación.

1.4.3. Células Troncales Embrionarias (CTEs)

Durante los primeros días de desarrollo, inicialmente las células troncales totipotentes restringen su potencial para dar lugar a los primeros linajes. Mientras en especies no mamíferas las primeras decisiones del linaje pueden implicar especificación de los ejes principales del cuerpo, los mamíferos tienen un diferente conjunto de prioridades. La discriminación entre tejido fetal y extra-embrionario comprende las 2 primeras decisiones del linaje y precede al establecimiento de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) y la línea germinal durante varios días. Esta única estrategia de desarrollo en mamíferos implica tipos celulares únicos que pueden aislarse y expandirse en cultivo como líneas de células tróncas estables. Las CTEs poseen la capacidad de dividirse durante largos periodos y retener la capacidad de originar cualquier tipo celular dentro del organismo. Estas células son de origen embrionario, siendo la mayoría derivadas del embrión desarrollado en cigotos que han

sido fertilizados *in vitro* y donados para propósitos de investigación previo consentimiento informado de los donantes.

Los embriones que proporcionan las CTEs normalmente tienen 4 o 5 días, después de la fecundación el cigoto se origina la **mórula**, cuyas células se denominan blastómeros y forman una esfera a partir de la cual se constituye el **blastocisto** en el que podemos distinguir; una **masa celular interna (MCI)** que formará el embrión, otra masa celular externa circundante (**trofoblasto**) que formará la placenta y en el interior de la mórula se acumula líquido formándose una cavidad hueca (**blastocelo**).

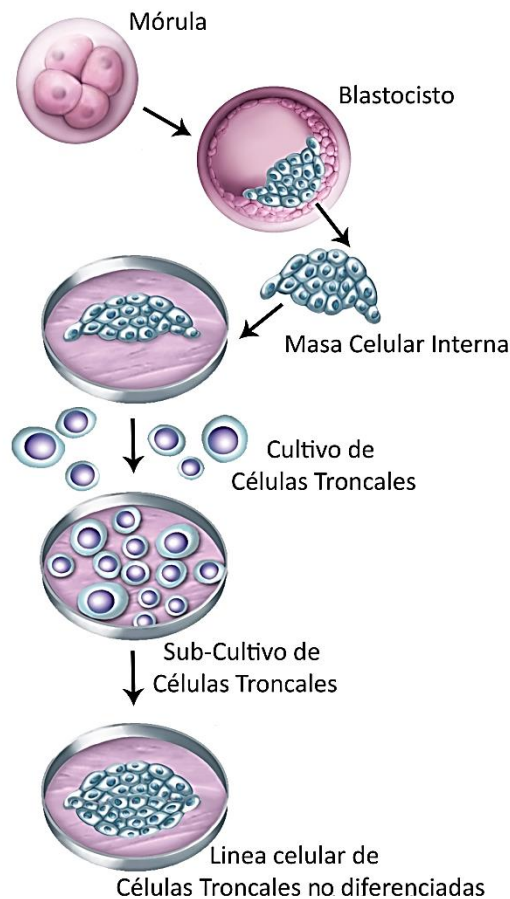


FIGURA 7. Representación esquemática de la derivación de células troncales embrionarias (CTEs), donde las células troncales se aíslan de la MCI y se cultivan en las condiciones apropiadas, de forma que son capaces de proliferar continuamente y constituir líneas celulares de células troncales embrionarias (CTEs).

La derivación para obtener las CTEs, tiene lugar mediante el aislamiento y cultivo celular de las células de la MCI en una placa de cultivo de laboratorio que contiene el medio de

cultivo, de forma que en un ambiente con la humedad y temperatura adecuadas las células se dividen y crecen sobre la superficie de la placa. Durante varios días las células de la MCI proliferan y cubren la placa de cultivo, después se transfieren a una nueva placa de cultivo, este proceso se repite varias veces, lo que se denomina sub-cultivo (pase celular) y después de al menos 6 meses el conjunto original de células de la MCI dará lugar a millones de CTEs. Dado que estas células han proliferado en cultivo celular durante 6 o más meses sin diferenciarse constituyen células troncales pluripotentes que además, una vez sometidas a una caracterización celular y molecular específica, y demostrado ser genéticamente estables constituyen una línea celular de CTEs útil para experimentación.

1.5. Regulación transcripcional de las CTEs

Las CTEs son células pluripotentes capaces de diferenciarse hacia cualquier tipo celular del cuerpo. La pluripotencia de las CTEs ha generado una gran repercusión por su posible uso en terapia celular y tisular. Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan la pluripotencia y la diferenciación de las CTEs son en gran parte desconocidos, encontrándose la pluripotencia de las CTEs humanas regulada por una combinación de factores intrínsecos y extrínsecos.

El desarrollo multicelular de los organismos está marcado por un intrincado y complejo proceso de diferenciación celular en el cual las células gradualmente pierden su plasticidad de desarrollo para adquirir funciones especializadas. A pesar de que presentan idéntico conjunto de material genético, las células de cada organismo individual exhiben claras distinciones en su morfología y funciones celulares. Tales diferencias en la especialización celular revelan la distinta y dinámica regulación de la información albergada en el ácido desoxirribonucleico (DNA) genómico. Esta expresión controlada de genes está regulada por los factores de transcripción moduladores del genoma. En humanos, los factores de transcripción pertenecen a una gran familia

(Lander et al., 2001) constituida por proteínas de unión a DNA que se unen a elemento reguladores tales como potenciadores, silenciadores o promotores de los genes. Además de la participación con interacciones directas con el DNA, los factores de transcripción también reclutan otros moduladores de la transcripción al genoma, como son los modificadores epigenéticos que añaden una nueva dimensión de complejidad a la regulación transcripcional.

1.5.1. Controles intrínsecos

En el mantenimiento del estado no diferenciado de las CTEs es esencial la acción de los factores de transcripción algunos de los cuales son específicos de las CTEs. Estos factores intrínsecos que regulan la pluripotencia de las CTEs incluyen una batería de factores de transcripción que no actúan necesariamente en genes dianas, sino que pueden funcionar junto con otros factores de transcripción para mediar la regulación génica como ocurre con la asociación transcripcional entre *OCT4* y *SOX2*. La intrincada interacción y asociación de los factores de transcripción y su unión a diversos genes diana establece una compleja red transcripcional que apoya y mantiene la identidad de las CTEs. En el corazón de esta red transcripcional, el trio de factores de transcripción *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* (Biswas y Hutchins, 2007; Darr y Benvenisty, 2006) constituyen el núcleo transcripcional que preserva la autorrenovación y pluripotencia de las CTEs:

- ***OCT4***: Expresado a partir del gen *POU5F1*, es un factor clave en las CTEs cuya expresión es alterada en la diferenciación. Se trata de un factor de transcripción homeodominio de la familia de proteínas POU, encuadrado dentro de la clase de factores de transcripción octaméricos que se unen a secuencias de 8 pares de bases (pb) de DNA. El primer evento de diferenciación ocurre cuando las células de la capa externa de la mórula se diferencian hacia trofoectodermo formando un blastocisto. El trofoectodermo formará luego la placenta, mientras que las células del interior del blastocisto que constituyen la MCI dan lugar a todas las

células del adulto. Es crucial que las CTEs mantengan un nivel apropiado de *OCT4* para mantener la pluripotencia. Cuando la expresión de *OCT4* se incrementa o disminuye en un 50% de los niveles de expresión normal, las CTEs son inducidas a diferenciarse (Niwa et al., 2000).

- **SOX2:** Se trata de un miembro de la familia de factores de transcripción SOX relacionado con la región SRY (Región determinante del sexo Y) que posee un dominio de unión a DNA conocido como grupo de alta movilidad (HMG). Este factor parece preservar la estabilidad de las CTEs mediante el mantenimiento de la expresión de *OCT4* a niveles apropiados (Masui et al., 2007). A parte de ser una diana transcripcional de *SOX2*, *OCT4* puede formar heterodímeros con *SOX2* en los cuales ambos factores de transcripción sinérgica y cooperativamente unen elementos que regulan varios genes específicos de las CTEs (Rodda et al., 2005; Kuroda et al., 2005; Ambrosetti et al., 2000, 1997; Botquin et al., 1998; Nishimoto et al., 1999; Yuan et al., 1995) incluyéndose a los de ellos mismos (Chew et al., 2005; Okumura-Nakanishi et al., 2005; Maruyama et al., 2005).
- **NANOG:** es un factor que funciona como un dímero (homeodominio) y su dimerización es importante para su función en la preservación de la autorrenovación y la pluripotencialidad de las CTEs (Mullin et al., 2008). Además, la dimerización de *NANOG* es vital para su interacción con otras proteínas relacionadas con la pluripotencia. Se expresa específicamente en células de la MCI y PGCs, donde de forma similar a *OCT4* disminuye su expresión durante la diferenciación de las CTEs, por tanto ambos factores son críticos para asegurar la pluripotencia (Ivanova et al., 2006; Loh et al., 2006). Se ha visto que *NANOG* juega un importante rol con otros factores relacionados con la pluripotencia que son importantes para mediar en un estado fundamental pluripotente de las CTEs (Silva et al., 2009). Por tanto, es esencial para el establecimiento de la pluripotencia pero dispensable para el mantenimiento de la autorrenovación y la pluripotencia de las CTEs.

- **Otros:** Además de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, otros factores de transcripción contribuyen al apoyo de la autorrenovación y la pluripotencia en las CTEs. Como ***REX1*** y el factor **Krüppel-like (*KLF*)**, que son factores de transcripción con dominios de dedos de zinc, implicado; el primero en la regulación del estado pluripotente, aunque el mecanismo por el cual es regulado no está claro, parece ser que está bajo control de una red de factores de transcripción, entre los que se encuentran implicados *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* que intervienen en la regulación de su expresión (Shi et al., 2006; Dambrot et al., 2011; Son et al., 2013); y el segundo con un rol definido en el mantenimiento de la autorrenovación de las CTEs (Jiang et al., 2008). Se han identificado otros 2 factores de transcripción, ***TBX3*** y ***ESRRB*** que son importantes también para preservar la autorrenovación de las CTEs (Nichols y Smith, 2012; Rao y Orkin, 2006). El factor **c-MYC** fue el primer factor descubierto en 1979 y está activado en un 30-50% de los tumores humanos (Nesbit et al., 1999). Este factor es una proteína con dominio B-HLH-LZ (región básica-hélice lazo hélice-cremallera de leucina) que le sirve para formar un heterodímero con la proteína MAX, constituyendo la forma transcripcionalmente activa que se une a una región de 6 bases denominada Secuencia E (E box) presente en muchos genes, encontrándose unido al promotor del 10% de los genes de diferentes especies, lo que supone cerca de 3000 genes en el genoma humano (Orian et al., 2003; Zeller et al., 2006; Dang et al., 2006). Esto incluye también las CTEs, en las que se evidencia que c-MYC tiene un perfil diferente al de *NANOG*, *SOX2* y *KLF4* (Kim et al., 2008). Además regula la expresión de varios miRNAs (Dews et al., 2006; O'Donnell et al., 2005). En general c-MYC tiene numerosos efectos biológicos, siendo esencial para el mantenimiento de la pluripotencia y autorrenovación en las CTEs (Varlakhanova et al., 2010). Por otro lado, **LIN28** que no se trata de un factor de transcripción, sino que es una proteína con un dominio de unión al ácido ribonucleico (RNA), que actúa como regulador negativo de la expresión de los miRNAs al bloquear el procesamiento

de los pre-miRNAs. Cada miRNA en el genoma humano es capaz de silenciar un conjunto de genes diana, existiendo entre ellos genes importantes para el desarrollo y la diferenciación (Kedde y Agami, 2008), de forma que LIN28 puede revertir el efecto diferenciador de los miRNAs, regulando la transición entre un estado pluripotente y el compromiso a un linaje celular determinado (Tzialikas y Romer-Seibert, 2015).

1.5.2. Controles extrínsecos

A diferencia de las CTEs murinas, un factor extrínseco como es el LIF no es suficiente para mantener la pluripotencia en las CTEs humanas, donde la señalización FGF y el balance entre TGF- β (Factor de crecimiento transformante beta), activina y señalización BMP (Proteínas morfogénicas ósea) son esenciales para la autorrenovación de las CTEs humanas.

La superfamilia de ligandos TGF- β , la cual contiene unos 40 ligandos en el genoma humano, juega el mayor papel en el mantenimiento de la autorrenovación de las CTEs humanas. A través de la **vía de señalización TGF- β /Activina/Nodal**, la cual implica la activación de la proteína SMAD2/3 a través de receptores Tipo I ALK4/5/7 (Quinasa similar al receptor de activina 4/5/7). La activación de la rama TGF- β /Activina/Nodal a través de SMAD2/3 está asociada con la pluripotencia y es requerida para el mantenimiento del estado no diferenciado en las CTEs humanas.

En contraste a la señalización TGF- β /Activina/Nodal, la cual promueve el mantenimiento de las CTEs humanas pluripotentes, la **vía de señalización BMP** es incapaz de soportar la autorrenovación y está asociada con la diferenciación hacia trofoblasto o endodermo extraembrionario. En las CTEs humanas, la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) induce la diferenciación hacia mesodermo y ectodermo, mientras que la proteína morfogénica ósea 2 (BMP2) promueve la diferenciación hacia endodermo extraembrionario. La represión de la señalización BMP en las CTEs humanas mediante los factores nogina y

bFGF apoya la autorrenovación a largo plazo. El bFGF es conocido como el mejor factor promotor de la autorrenovación en las CTEs humanas, mediante la activación de la ruta PI3K/Akt. Una vez activada se promueve la proliferación, supervivencia, crecimiento y motilidad celular y está implicada también en la tumorigenicidad. Además, la activación de PI3K/Akt dependiente del bFGF es requerida para la eficiente expresión de proteínas de la matriz extracelular (MEC) (Xiao et al., 2006; Conley et al., 2007; Wang et al., 2005; Xu et al., 2005).

Las proteínas WNTs constituidas por un grupo de proteínas que forman parte del grupo de moléculas de señalización para procesos biológicos y del desarrollo, desempeñan un importante papel en el control del mantenimiento de las CTEs. La **vía de señalización WNT** es conocida por estar implicada en la regulación de la proliferación de las células troncales. Los componentes de la vía de señalización WNT están presentes en las CTEs, aunque los niveles de los diferentes receptores varían entre poblaciones de células no diferenciadas y diferenciadas. Esta vía se cree que es capaz de estimular tanto la proliferación de las CTEs humanas como la diferenciación (Xiao et al., 2006; Miyabayashi et al., 2007; Davidson et al., 2007).

Un lisofosfolípido bioactivo, la **Esfingosina-1-fosfato (S1P)** también mantiene la autorrenovación de las CTEs humanas. La S1P ha sido implicada en diversos procesos biológicos, que incluyen crecimiento celular, diferenciación, migración y apoptosis en muchos tipos celulares distintos. Debido a que la prevención de la apoptosis es un mecanismo de autorrenovación común, S1P potencialmente ayuda al proceso de autorrenovación en las CTEs humanas. El **factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)** ha sido implicado también en la prevención de la apoptosis. La combinación del PDGF extracelular y S1P mantiene la autorrenovación de las CTEs humanas (Chase y Firpo, 2007; Inniss y Moore, 2006).

1.6. Diferenciación de las CTEs hacia células productoras de insulina

Las CTEs exhiben como acabamos de exponer, una serie de vías de señalización implicadas en la autorrenovación y pluripotencia que son interdependientes y muestran una serie de mecanismos relacionados. Descifrar estas vías es esencial para la generación de metodologías mejoradas para el mantenimiento y la proliferación de las CTEs pluripotentes *in vitro*, que junto con la comprensión de los factores exógenos y endógenos que controlan la autorrenovación y la diferenciación, facilitará el uso de estas células en terapias basadas en células y permitirá la comprensión de los procesos tempranos del desarrollo. Diversos factores están involucrados tanto en el mantenimiento del estado no diferenciado como en la diferenciación de las células troncales, incluyendo la estructura celular, factores de crecimiento, interacciones celulares, el estado nutricional, la rigidez y composición de la matriz, la tensión mecánica, la adhesión célula-matriz y el microambiente o nicho celular (anoxia, hipoxia y normoxia; temperatura; humedad) como se observa en la **Figura 8**.

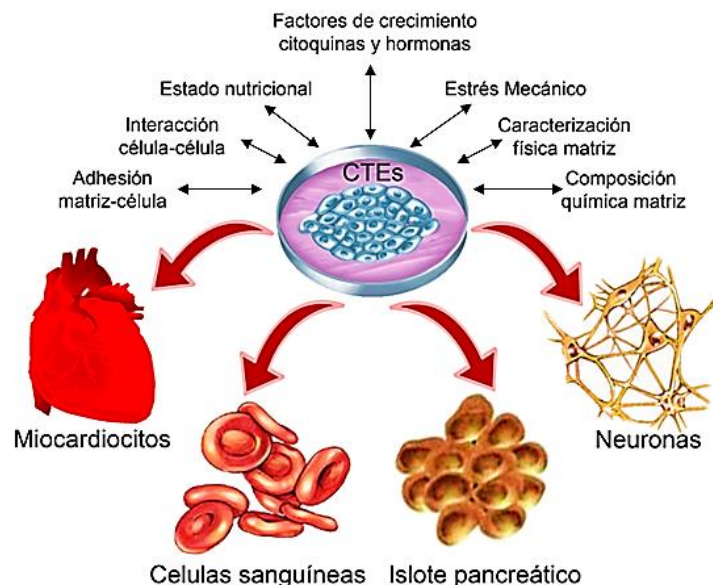


FIGURA 8. Las CTEs aisladas de la MCI del blastocisto pueden mantenerse en estado no diferenciado o diferenciarse *in vitro* en diversos tipos celulares específicos, mediante el control ejercido por varios factores intrínsecos transcripcionales y factores extrínsecos.

1.6.1. Diferenciación espontánea

Las células troncales residen dentro de microambientes especializados que constituyen el nicho celular, el cual modula la proliferación y diferenciación, la prevalencia simétrica frente a la división asimétrica y las protege del estrés fisiológico. Durante el desarrollo embrionario, un complejo conjunto de señales regula estos procesos fisiológicos en las células troncales pluripotentes, dirigiéndolas hacia un compromiso con determinados fenotipos celulares. Estas señales constituyen una red reguladora transcripcional muy controlada que mantiene las células con capacidad de autorrenovación y pluripotencia, de cuyo equilibrio depende la posibilidad de diferenciarse hacia tipos celulares especializados. Así, mientras las CTEs proliferan en cultivo bajo las condiciones apropiadas se mantendrán en estado no diferenciado, pero cuando se permite la salida de este estado las células tienden a agruparse formando cuerpos embrionarios (EBs), que corresponden a estructuras tridimensionales muy semejantes a los embriones en los primeros estadios de desarrollo y se desencadena una modificación de la red reguladora que inicia un proceso de diferenciación espontáneo y pueden constituir diversos tipos celulares. Aunque la diferenciación espontánea es una buena indicación de que el cultivo de las CTEs es adecuado, se trata de un proceso no dirigido y por tanto una ineficiente estrategia para producir cultivos celulares específicos con fines terapéuticos, de modo que una de las principales dificultades de la terapia celular radica en el control de su diferenciación hacia las células o tejidos deseados.

1.6.2. Diferenciación dirigida

En los últimos años, han sido identificados un gran número de factores de crecimiento que en función de su actividad biológica son capaces de diferenciar las CTEs selectivamente hacia linajes mesodérmico, endodérmico o ectodérmico (Schuldiner et al., 2000), concluyendo que tales moléculas pueden desempeñar papeles importantes durante la embriogénesis y se pueden utilizar para dirigir o apoyar la diferenciación de células troncales pluripotentes. Dilucidar y recapitular todos estos biofactores es

esencial para controlar la diferenciación de las células troncales y dirigir de forma fiable la diferenciación de las CTEs hacia tipos celulares específicos, ofreciendo la posibilidad de una fuente renovable de células y tejidos de reemplazo para un posible tratamiento de enfermedades, incluyendo por ejemplo la diabetes, degeneración macular, artritis o cardiopatías.

En la obtención de células productoras de insulina se pueden distinguir las siguientes etapas fundamentales: especificación, diferenciación y maduración. Las CTEs se diferencian en células productoras de insulina a través de las siguientes etapas: la especificación del endodermo definitivo y tejido pancreático a partir del tubo primitivo del intestino y del intestino anterior del páncreas; la diferenciación de progenitores pancreáticos y el desarrollo de las células productoras de insulina maduras caracterizadas por la expresión de determinados factores de transcripción. Las vías de transducción de señales implicadas en la obtención de células productoras de insulina a partir de las CTEs han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas. Una comprensión completa del desarrollo pancreático viene determinada por el conocimiento de todas las señales extracelulares en las diferentes etapas y también por los mecanismos moleculares fundamentales de cada molécula y factor que activan una respectiva señal para dar lugar a la diferenciación de las CTEs. La atención se ha centrado en gran medida en la identificación de las redes fundamentales de moléculas y vías de señalización en el desarrollo de las células productoras de insulina.

Los protocolos de diferenciación utilizados hasta la fecha pretenden simular los eventos que tienen lugar durante el desarrollo del páncreas y la diferenciación de los islotes pancreáticos. Esto requiere un amplio conocimiento de las vías de señalización implicadas, para la inclusión de moléculas de señalización en el medio de cultivo que simulen a los factores de crecimiento secretados. Actualmente, se han identificado varias moléculas que actúan como señales extracelulares para el correcto desarrollo del linaje de pancreático, en el que la primera etapa del endodermo definitivo recibe

señales de los tejidos adyacentes. Al inicio del desarrollo pancreático, las señales de la superfamilia TGF- β de activinas juegan un papel primordial. La presencia de activina y la alta señalización nodal en esta etapa son suprimidas por una regulación negativa de la vía de señalización PI3K para activar la pluripotencia de las CTEs (McLean et al., 2007). La vía de señalización PI3k activada utiliza fosfatidilinositol mono-, bi- o tri-fosfato para activar a la proteína quinasa B (PKB o AKT) y la GSK3 β . La inhibición de PI3K y AKT, junto con una alta señalización nodal inducen la diferenciación de las CTEs hacia el endodermo definitivo (Hori et al., 2002; Vallier et al., 2009; Chen et al., 2006). La activina A ha demostrado desempeñar un papel fundamental en la migración de los islotes pancreáticos y la regulación de la diferenciación celular endocrina y exocrina durante la formación inicial del páncreas (Moriya et al., 2000; Maldonado et al.; Kim et al., 2000; Shiozaki et al., 1999; Zhang et al., 2002; Furukawa et al., 1995). La vía de señalización Wnt es otra vía importante en el desarrollo pancreático, principalmente en la polaridad celular, la migración y la proliferación. Si esta vía promueve la autorrenovación o la diferenciación de las células troncales durante la diferenciación y organogénesis es objeto de controversia. Aproximadamente se han identificado 20 moléculas diferentes de la familia Wnt, entre ellas algunas interaccionan con el receptor Frizzled (FRZ) y activan una proteína llamada DVL para bloquear a la GSK3 β , la cual fosforila a la CTNNB. Por tanto, la CTNNB defosforilada se acumula en el citoplasma formando un complejo con el factor TCF7L2 en el núcleo (Liu y Habener, 2010). Este complejo es importante para el desarrollo del páncreas y la secreción de insulina. La vía de señalización Wnt es más importante durante las etapas iniciales que en las etapas tardías de la diferenciación de las CTEs. Se ha visto que *OCT4* reprime la vía de señalización Wnt durante el proceso de autorrenovación y la señalización de CTNNB fue observada solo con *OCT4* bloqueado. Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que la vía de señalización Wnt funciona principalmente en la diferenciación, pero no en la autorrenovación de las CTEs y además, se ha observado que la activación de la señalización Wnt/CTNNB, mediante la adición de Wnt3a puede estimular la

proliferación de las CTEs (Davidson et al., 2012). En conjunto estas observaciones, han desembocado en varios estudios que sugieren la combinación de Wnt3a y activina A para promover la diferenciación de las CTEs hacia el endodermo definitivo (Kroon et al., 2008; Johannesson et al., 2009; Mfopou et al., 2010; D'Amour et al., 2006). Otra ruta destacada en el desarrollo pancreático es la vía de señalización BMP, que actúa como un inhibidor en las etapas tempranas del desarrollo del endodermo, mientras que se requiere en la última parte de la formación de células progenitoras de pancreáticas (Cai et al., 2010; Zhang et al., 2009; Vallier et al., 2009), esta vía de señalización es controlada por la proteína nogina (Jiang et al., 2007a; Kroon et al., 2008). Por otro lado, la inhibición de la vía de señalización Shh en las células humanas y murinas promueve la formación del linaje pancreático (Kawaguchi et al., 2002; Kim y Melton, 1998; Hebrok et al., 2000; Lau y Hebrok, 2010). En las primeras etapas, durante la formación del mesendodermo y el endodermo definitivo, la activina A y el bFGF se usan para inhibir la vía de señalización Shh (Jiang et al., 2007a; D'Amour et al., 2006). Así como, el bFGF y la ciclopamina se utilizan posteriormente en la expansión de progenitores pancreáticos (D'Amour et al., 2006).

1.6.3. Protocolos de diferenciación

Los primeros estudios para la obtención de células productoras de insulina a partir de las CTEs murinas (Shiroi et al., 2002; Soria et al., 2001, 2000) y humanas (Assady et al., 2001; Lumelsky et al., 2001), indicaron que se pueden obtener *in vitro* a partir de células pluripotentes espontáneamente diferenciadas. Esta diferenciación espontánea tenía un rendimiento muy bajo, insuficiente para una aplicación clínica. Durante la última década muchos grupos han contribuido a generar protocolos de diferenciación que simulan desarrollo del páncreas (Van Hoof et al., 2009). A partir de los estudios iniciales sobre la formación del endodermo definitivo, varios protocolos han sido publicados para la generación de células productoras de insulina, simulando el amplio conocimiento adquirido en el desarrollo pancreático en *Xenopus* y roedores (Van Hoof et al., 2009;

Rezania et al., 2012; Chen et al., 2009; Kroon et al., 2008; D'Amour et al., 2006). Se obtuvieron grandes poblaciones de células que expresan factores de transcripción presentes en endodermo pancreático, incluyendo *PDX1* y *NEUROG3*. Sin embargo, un gran porcentaje de las células eran poli-hormonales, al expresar simultáneamente somatostatina, glucagón y/o insulina (Bruin et al., 2014). La expresión de múltiples marcadores hormonales dentro de una sola célula y la mala respuesta a la glucosa en cuanto a la liberación de insulina, sugirió que los protocolos requieren nuevas mejoras. En base al protocolo de diferenciación de D'Amour et al., una compañía de biotecnología en San Diego (ViaCyte), intervino de forma importante en el desarrollo de protocolos para generar células productoras de insulina a partir de células troncales con respuesta a estímulos de glucosa, mediante el trasplante de células progenitoras pancreáticas encapsuladas en ratones donde posteriormente maduran hasta convertirse en células beta pancreáticas funcionales *in vivo* capaces de proteger contra la hiperglucemia inducida por estreptozotocina (STZ) (Kroon et al., 2008). En un trabajo más reciente, las células progenitoras pancreáticas se diferenciaron en células productoras de insulina con un alto porcentaje ($\approx 80\%$) de células endocrinas, de las cuales la mitad expresaron insulina (Agulnick et al., 2015). Recientemente, se han publicado otros protocolos mejorados para la generación de células productoras de insulina sensibles a glucosa (Pagliuca et al., 2014; Russ et al., 2015; Pezzolla et al., 2015; Rezania et al., 2014). En todos ellos, las células se cultivan en suspensión para simular mejor las condiciones del crecimiento *in vivo* y la diferenciación. Existe una considerable variación entre los protocolos para la formación del endodermo definitivo y progenitores pancreáticos, aunque las condiciones de cultivo para conducir las células a partir de precursores pancreáticos endocrinos a células productoras de insulina inmaduras y finalmente a madurar son muy similares.

Sin embargo, existe una serie de retos que deben ser superados antes de llegar a una terapia basada en células productoras de insulina para el tratamiento de la diabetes. Uno de los principales problemas a superar es la maduración completa de las células

productoras de insulina *in vitro*, ya que las células diferenciadas secretan generalmente muy bajo nivel de insulina, expresan varias hormonas y muestran una respuesta insuficiente a la estimulación de glucosa. Otro reto es la supervivencia a largo plazo de los implantes de células productoras de insulina, ya que el trasplante de células extra-pancreáticamente podrían sufrir una dediferenciación o incluso cambiar a otros tipos celulares. Además, las CTEs murinas y humanas son diferentes en muchos aspectos, de forma que trasladar la investigación de animales a humanos requiere extremar las precauciones. Si bien hasta el momento existen fuertes evidencias que confirman que las células productoras de insulina generadas pueden reducir la hiperglucemia en roedores, la capacidad de estas células para el tratamiento de los pacientes diabéticos no ha sido comprobada y la generación de células a gran escala para la aplicación clínica constituye otro obstáculo, aunque los recientes avances hacen indicar que la meta está cada vez más próxima. Por otra parte, persiste la incógnita de cuál podría ser la reacción del sistema inmune del huésped frente a las células productoras de insulina obtenidas, ya que similar a la situación del trasplante de islotes pancreáticos, las células troncales trasplantadas también enfrentan el problema del rechazo inmunológico, de modo que el reto para una terapia basada en células con éxito en el tratamiento de la diabetes no es sólo la obtención de células productoras de insulina funcionales, sino también el bloqueo de la respuesta autoinmune. Por ello, muchos de los esfuerzos de la investigación actual se basan en técnicas que mejoren el implante de las células trasplantadas y evitar cualquier tipo de rechazo por el sistema inmunológico. En este sentido, una de las estrategias perseguidas ha consistido en utilizar una gran variedad de moléculas inmunosupresoras, ya sea aisladas o combinadas, para proteger a las células obtenidas de las CTEs del rechazo inmunológico, como podría ser la combinación del CTLA4-Ig, un fármaco aprobado por la Agencia de alimentos y medicamentos norteamericana (FDA), para el tratamiento de la artritis reumatoide que suprime las células T responsables del rechazo inmune y una proteína llamada PD-L1 que se sabe que es importante para la inducción de la tolerancia inmune en tumores, que ha

permitido sobrevivir a las células alogénicas en ratones humanizados, los cuales se caracterizan por expresar un sistema inmunológico equivalente al humano, sin provocar el rechazo inmune (Rong et al., 2014). Otra estrategia reciente que se ha perseguido activamente como un medio de afrontar el ataque autoinmune, consiste en la encapsulación celular. En este caso, se lleva a cabo la protección de las células encapsuladas del sistema inmunitario al tiempo que se permite una oxigenación adecuada, el tránsito de nutrientes y glucosa, y el transporte de insulina a través de la barrera. Aunque no se ha descrito una exitosa y reproducible encapsulación de islotes pancreáticos humanos que dure más de unas pocas semanas en pacientes con diabetes tipo 1, ViaCyte defiende que las células productoras de insulina obtenidas a partir de células troncales pueden funcionar *in vivo* en sus dispositivos de macro-encapsulación patentados (Agulnick et al., 2015). Por tanto, a pesar de que se trata de retos importantes, hay muchas razones para creer que la terapia de reemplazo de células beta pancreáticas puede convertirse en una realidad clínica para el tratamiento de pacientes con diabetes.

1.7. Regulación epigenética de las CTEs

El principal rol de la epigenética es la regulación de genes, este proceso es clave en diferentes procesos celulares como pueden ser:

- La modulación individual de genes y su actividad;
- El desarrollo y diferenciación de tipos celulares mediante grupos de genes que son funcionales en cada tipo celular específico.
- La plasticidad metabólica celular, que le permite adaptarse a los cambios exógenos.

Comprender todos los mecanismos moleculares gobernantes que controlan las CTEs es de inmenso interés biológico. Como se ha comentado con anterioridad, trabajos previos han identificado una red transcripcional dirigida por factores de transcripción tales

como *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, esenciales para mantener el estado no diferenciado pluripotente de las células troncales (Jaenisch y Young, 2008). La red sostiene el estado activo de genes que son requeridos para la supervivencia de las células troncales y su proliferación, a la vez que reprime los genes requeridos para la diferenciación (Boyer et al., 2005).

Las modificaciones epigenéticas pueden regular la expresión génica, ya sea activándola o reprimiéndola. La regulación genética y epigenética son igualmente cruciales en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las CTEs, de forma que los factores de transcripción y los mecanismos epigenéticos muestran elevados niveles de expresión en las CTEs, los cuales someten a un silenciamiento génico global previniendo o activando la diferenciación (Efroni et al., 2008; Horrillo et al., 2013). El estudio en los últimos años ha avanzado en gran medida la comprensión del control epigenético de las CTEs. Los factores epigenéticos parecen ser esenciales para la regulación de la diferenciación celular y el mantenimiento del estado de las células diferenciadas. Un preciso orden temporal de la expresión génica durante el desarrollo es fundamental para garantizar el compromiso adecuado del linaje, la determinación del destino celular y en última instancia la organogénesis. La regulación epigenética que puede tener lugar mediante diferentes mecanismos como son la metilación/desmetilación del DNA, modificación de histonas, control del ncRNA o remodelación nucleosómica como se observa en la **Figura 9**, resulta esencial para la activación o represión de genes durante el desarrollo embrionario. Al comparar los patrones de modificación de histonas y la metilación del DNA entre las células diferenciadas y las CTEs, se estima que aproximadamente un 30% del genoma difiere en la estructura de la cromatina (Hawkins et al., 2010). Muchas de estas diferencias se pueden atribuir a la diferente unión de factores de transcripción y remodelación del estado de la cromatina durante la diferenciación (Hawkins et al., 2010; Gifford et al., 2013). Estos datos respaldan que la regulación genética se encuentra estrechamente entrelazada a la regulación epigenética, por lo que la compleja interacción entre factores de transcripción y modificadores epigenéticos mantiene a las

CTEs en su estado de autorrenovación y pluripotencia o inducen la salida hacia un linaje determinado (Calvanese et al., 2010; Horrillo et al., 2013). Una comprensión total de la regulación epigenética de la diferenciación y la identidad celular es muy importante para entender aún más el potencial de las CTEs y sus derivados en la terapia celular. Este conocimiento de los estados epigenéticos celulares permitirá en un futuro desarrollar tipos celulares o combinaciones de ellos, que representan fielmente a las células y tejidos humanos.

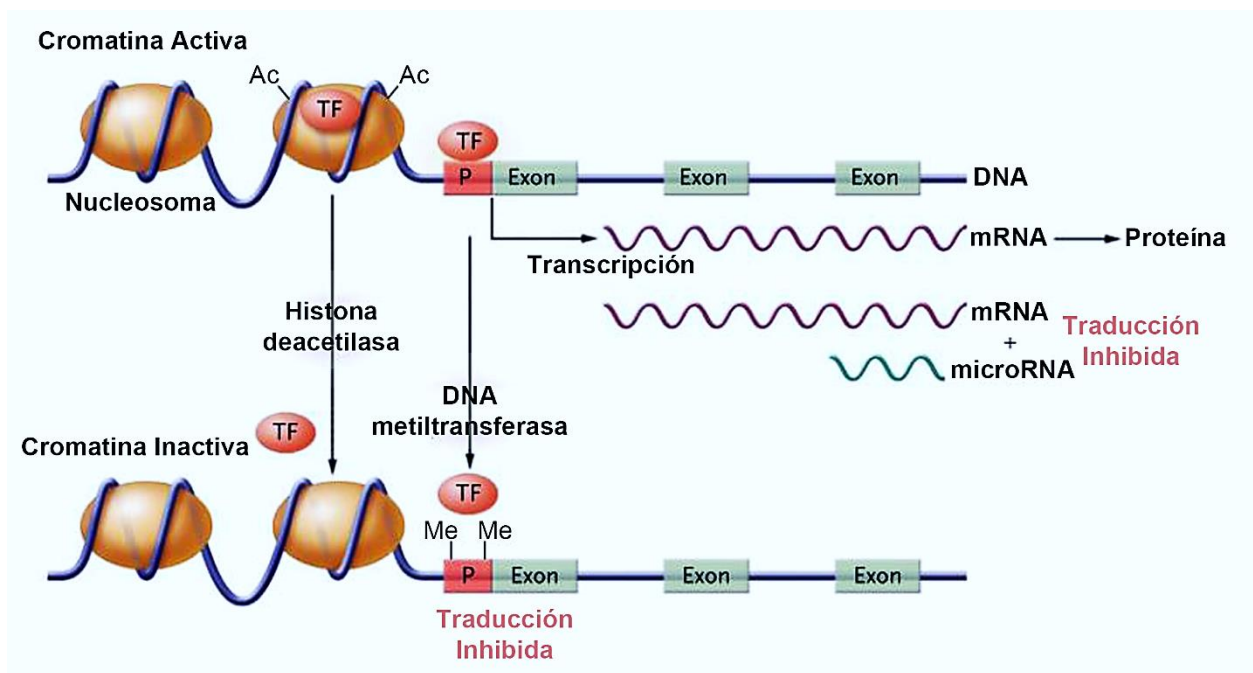


FIGURA 9. Modificación epigenética de histonas o del propio DNA controla los accesos de los factores de transcripción a la secuencia de DNA. De modo que modulan el nivel de transcripción del mRNA. La cromatina transcripcionalmente activa se caracteriza por la presencia de grupos acetilo en residuos específicos de lisina del núcleo de histonas en el nucleosoma, el cual disminuye su unión al DNA y resulta en una estructura más abierta de la cromatina que permite el acceso de factores de transcripción. Además las islas CpG en la región promotora de genes activamente transcritos están generalmente desmetilados, permitiendo la unión de los factores de transcripción. La cromatina transcripcionalmente inactiva se caracteriza por la deacetilación de histonas, metilación de promotores CpG y disminución de la unión de los factores de transcripción. Otro nivel de control epigenético es proporcionado por los miRNAs (19 a 24 nucleótidos de longitud) que silencian la expresión de determinados genes (Gluckman et al., 2008).

Por tanto, la regulación génica suele verse afectada por características epigenéticas como la metilación del DNA, la estructura de la cromatina y RNA no codificantes (ncRNAs). En eucariotas, el DNA es empaquetado en forma de cromatina, cuyo

elemento básico es el nucleosoma, que está formado por 147 pb de DNA enrollado alrededor de un octámero constituido por heterodímeros de proteínas, las histonas H3/H4 y H2A/H2B (Luger et al., 1997). La estructura de la cromatina puede influenciar en la expresión génica mediante el control de la accesibilidad de elementos reguladores y modulando la afinidad de los factores de transcripción a sus regiones diana (Fraser y Bickmore, 2007). Los efectores clave de la estructura de la cromatina son las modificaciones post-transcripcionales de histonas y metilación del DNA genómico (Campos y Reinberg, 2009; Bernstein et al., 2007), mientras que los factores remodeladores de la cromatina dependientes de ATP pueden modular el estado de la cromatina (Morrison y Shen, 2009) y más recientemente el descubrimiento de la regulación de los ncRNAs (Saito et al., 2006; Lujambio et al., 2007). La creciente evidencia indica que los transcritos de ncRNA son funcionales, especialmente en la regulación de procesos epigenéticos y por tanto los ncRNAs están emergiendo como reguladores importantes de diversas funciones. Así, los ncRNAs representan una nueva frontera de la genética molecular, biología molecular, fisiológica, y la investigación biológica celular con enorme potencial para avanzar en la comprensión de los procesos biológicos en la salud humana y la enfermedad.

1.8. Las moléculas reguladoras de RNA No Codificante (ncRNAs)

El ncRNA está constituido por moléculas de RNA funcional que se transcriben a partir del DNA, pero no se traduce en proteínas y constituyen un nivel mayor de control epigenético. Los ncRNAs asociados a la epigenética incluyen a los miRNAs, siRNAs, piRNAs y lncRNAs. En general, los ncRNAs funcionan regulando la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Estos ncRNAs implicados en mecanismos epigenéticos pueden ser divididos en 2 grupos principales; los ncRNAs cortos (<30 nucleótidos) y ncRNAs largos (>200 nucleótidos) y ambos desempeñan una importante función en la formación de la heterocromatina,

modificación de histonas, metilación del DNA y silenciamiento génico, regulando la tasa de síntesis de proteínas.

- ncRNAs Cortos:

- **microRNAs (miRNAs):** son pequeñas moléculas RNA (20-24 nt) derivados de un precursor que forma distintas estructuras en horquilla llamado pre-miRNA. La horquilla se procesa en un miRNA maduro y forma un complejo silenciador al asociarse con proteínas de la familia argonauta (Ago). Generalmente se unen a dianas específicas de los mRNAs con una secuencia complementaria para inducir la escisión, degradación o bloqueo de la traducción. Esto puede realizarse en el contexto de un mecanismo de retroalimentación que implica la metilación del cromosoma.
- **RNAs de interferencia (siRNAs):** moléculas muy similares estructural (20-24 nt) y funcionalmente a los miRNAs, mediando en el silenciamiento génico post-transcripcional como resultado de la degradación del mRNA. Además, también se ha visto que pueden inducir la formación de heterocromatina a través de un complejo silenciador al cual, con la unión de siRNAs promueve la metilación de histonas (H3K9) y la condensación de la cromatina (Carthew y Sontheimer, 2009).
- **RNA de interacción con PIWI (piRNAs):** se trata de una clase de pequeños RNAs no codificantes también muy similares a los más conocidos miRNAs, pero que se distinguen por ser ligeramente más largos (24-31 nucleótidos), expresados principalmente en la línea germinal y estar asociados a un subtipo diferente de proteínas de la familia argonauta (Piwi). La función primaria incluye la regulación de la cromatina y supresión de actividad de transposones en la línea germinal (Kaikkonen et al., 2011; Brennecke et al., 2007).

- ncRNAs Largos:

- **RNA largo no codificante (lncRNA)**: se consideran transcritos de mayor tamaño (>200nt) que no codifican para proteínas. La mayor parte de los ncRNAs pertenece a este grupo. La mayoría funcionan como remodeladores de la cromatina, en la regulación transcripcional o post-transcripcional y como precursores para siRNAs (St. Laurent et al., 2015; Bonasio y Shiekhataar, 2014).

1.9. Los pequeños RNAs No Codificantes: microRNAs

Uno de los avances recientes más sorprendentes en biología celular y molecular lo constituye la descripción de nuevos mecanismos de regulación de la expresión génica mediante pequeños RNAs reguladores de 20-30 nucleótidos. Los pequeños RNAs no codificantes (ncRNAs) tienen como diana tanto la cromatina como los transcritos con lo que ejercen un amplio control sobre el genoma y el transcriptoma. Gracias a los recientes progresos en los procesos de secuenciación a gran escala se ha descubierto un sorprendente y complejo panorama de pequeñas moléculas de RNA en las células eucariotas. El término pequeños RNAs no debe confundirse con otros términos parecidos dentro de la gran variedad de tipos de RNAs que se han encontrado en el interior de las células. Los pequeños RNAs vendrán determinados en base a su mecanismo biogénico, su pequeño tamaño (de 20 a 30 nucleótidos) y el tipo de proteína Argonauta al que están asociados (AGO o PIWI/HIWI). Como se ha comentado con anterioridad, en función de su origen, biogénesis y mecanismo efector se distinguen 3 familias principales de pequeños RNAs: microRNAs (miRNAs), pequeños RNAs interferencia (siRNAs) y RNAs de interacción con Piwi (piRNAs).

El más estudiado de los 3 grupos es el de los miRNAs, son unas pequeñas moléculas de RNA endógeno que no codifican para proteína y que actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica. Se trata de elementos genéticamente conservados y la desregulación en su expresión se asocia con varias enfermedades incluyendo la

diabetes, el cáncer o la neurodegeneración (Guay et al., 2011; Chang y Mendell, 2007; Garzon et al., 2009). Juegan un papel regulador muy importante en animales y plantas uniéndose a los mRNAs inhibiendo su traducción a proteína. Forman parte de una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras génicas en organismos multicelulares, influenciando en los niveles finales de muchos genes que codifican para proteínas, estando implicados en casi todos los procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, diferenciación y proliferación celular, muerte celular programada o apoptosis, señales de transducción, organogénesis, proliferación celular y defensa antiviral, entre otros (Bartel, 2009).

Los miRNAs fueron inicialmente descubiertas en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) por Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum (Lee et al., 1993), quienes descubrieron que *lin-4*, un gen que actuaba en el control del desarrollo de *C. elegans*, no codificaba para proteína, pero en cambio producía 2 RNAs pequeños, uno de 22 nucleótidos y otro de 61 nucleótidos de longitud. El más largo se vio que podía adoptar una estructura en forma de horquilla compuesta de un tallo y un bucle (*stem-loop*) y que era precursor del más corto. Los laboratorios de Ambros y Ruvkun observaron que estos RNAs de *lin-4* (Ruvkun y Giusto, 1989) mostraban zonas antisentido complementarias a múltiples sitios de la zona 3'-UTR del gen *lin-14* (Wightman et al., 1993; Lee et al., 1993) y observaron una disminución de la cantidad de proteína LIN-14 sin que hubiera una reducción de los niveles del mRNA (Ruvkun y Giusto, 1989). El pequeño RNA *lin-4* es ahora reconocido como el miembro fundador de una clase muy abundante de pequeños RNA reguladores denominados miRNAs (Lagos-Quintana et al., 2002; Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Se pensó que este modo de regulación de genes estaba restringido a los nematodos, sin embargo, desde el descubrimiento de *lin-4* en *C. elegans* se han ido descubriendo miRNAs en otras especies y ahora sabemos que muchos organismos multicelulares expresan miles de miRNAs, los cuales presentan un patrón de expresión dependiente del tipo celular y del tejido (Lagos-Quintana et al., 2002). No obstante, el segundo miRNA conocido como *let-7*, otro gen en *C. elegans* que

codificaba para un RNA regulador de unos 22 nucleótidos, no sería descrito hasta 7 años después. El let-7 actuaba promoviendo el desarrollo de la larva tardía hacia la forma adulta, así como lin-4 actuaba en el desarrollo temprano en la transición del primer estadio larvario al segundo (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). A raíz del descubrimiento del let-7, se fueron descubriendo homólogos en otros genomas como el humano o el de otros animales bilaterales constituyendo una gran familia, además de otros muchos miRNAs que desde el año 2002 están siendo registrados en la base de datos Sanger miRBase (<http://www.mirbase.org/>), la cual representa un archivo en línea de secuencias de miRNAs y según el último recuento en la versión 21 de junio de 2014 hay más de 35.828 miRNAs maduros registrados en 223 especies, que incluye más de 2.588 miRNAs identificados en humanos.

1.9.1. Biogénesis de los miRNAs

Los genes que codifican los miRNAs pueden variar su localización ampliamente en el genoma, localizándose principalmente dentro de los intrones de genes que pueden codificar para proteínas, pero también pueden encontrarse en regiones intergénicas o exónicas (Rodríguez, 2004; Zeng, 2006). En el primer caso, la expresión de los miRNAs puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen huésped y de esta manera explicaría una especificidad tisular debida a la expresión de diferentes grupos de genes (Lin et al., 2006; Bartel, 2004). En el segundo caso, la expresión de los miRNAs viene regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores (Zeng, 2006). También se ha observado que los miRNAs pueden estar derivados de secuencias repetitivas del DNA (Smalheiser y Torvik, 2005).

Los miRNAs maduros son moléculas de unos 20-30 nucleótidos de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Los miRNAs maduros se generan a través de múltiples etapas de procesamiento de escisiones secuenciales endonucleolíticas que se inician en el núcleo de la célula y culminan en el

citoplasma. Aunque se han descrito algunos casos de transcripción por la RNA-polimerasa III (Borchert et al., 2006), en la mayoría de los casos serán transcritos por la RNA-polimerasa II que produce una larga molécula precursora de RNA que puede exceder varias kilobases, conocida con el nombre de miRNA primario (pri-miRNA) (Lee et al., 2004; Cai et al., 2004). Este forma una estructura *stem-loop* (Lee et al., 2003) y será procesado en el núcleo por el complejo microprocesador, formado por la RNasa III conocida con el nombre de Drosha, que dimeriza con la proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge (DGCR8), también conocida como Pasha. Drosha escinde de forma asimétrica ambas cadenas en los sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de *stem-loop*, de forma que el producto resultante es una molécula de RNA precursora de unos 70-120 nucleótidos denominada pre-miRNA (Denli et al., 2004; Lee et al., 2003). Este es exportado al citoplasma de forma activa a través del complejo Exportina-5, dependiente de Ran-GTP (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003), en el que la proteína nuclear asociada a Ras (Ran) es un cofactor que une GTP durante la exportación nuclear del RNA. En el citoplasma, la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo exportador. En el citoplasma, los pre-miRNAs son reconocidos por el complejo de procesamiento de los pre-miRNAs formado por Dicer, la proteína de unión a RNA en respuesta a trans-activación (TRBP) y la proteína quinasa activadora dependiente de RNA de cadena doble inducible por interferón (PRKRA), dando lugar a una molécula de doble cadena conocida como miRNA dúplex (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003; Hutvágner et al., 2001; Grishok et al., 2001). Tras el procesamiento, se separan las 2 hebras del miRNA dúplex, dependiendo de varios factores tales como la asimetría termodinámica de los dúplex y la estabilidad de emparejamiento de bases en el extremo 5', determinándose una hebra guía que será preferentemente integrada con una de las 4 proteínas Argonautas (Ago) para formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003), el cual constituye la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o inhibición de la traducción, mientras que la otra hebra (hebra

pasajera o miR*), por lo general se degrada o en casos raros puede asociarse con proteínas Ago, permitiendo a ambas hebras servir como miRNAs funcionales (Krol et al., 2010; Okamura et al., 2009; Czech et al., 2009). Al RISC que lleva a cabo su acción asociado con la hebra guía del miRNA, se le conoce como miRISC y constituye el enzima catalítico que procesa el mRNA diana para bloquear su traducción. En la **Figura 10**, se refleja en detalle los procesos y factores implicados en la biogénesis de los miRNAs.

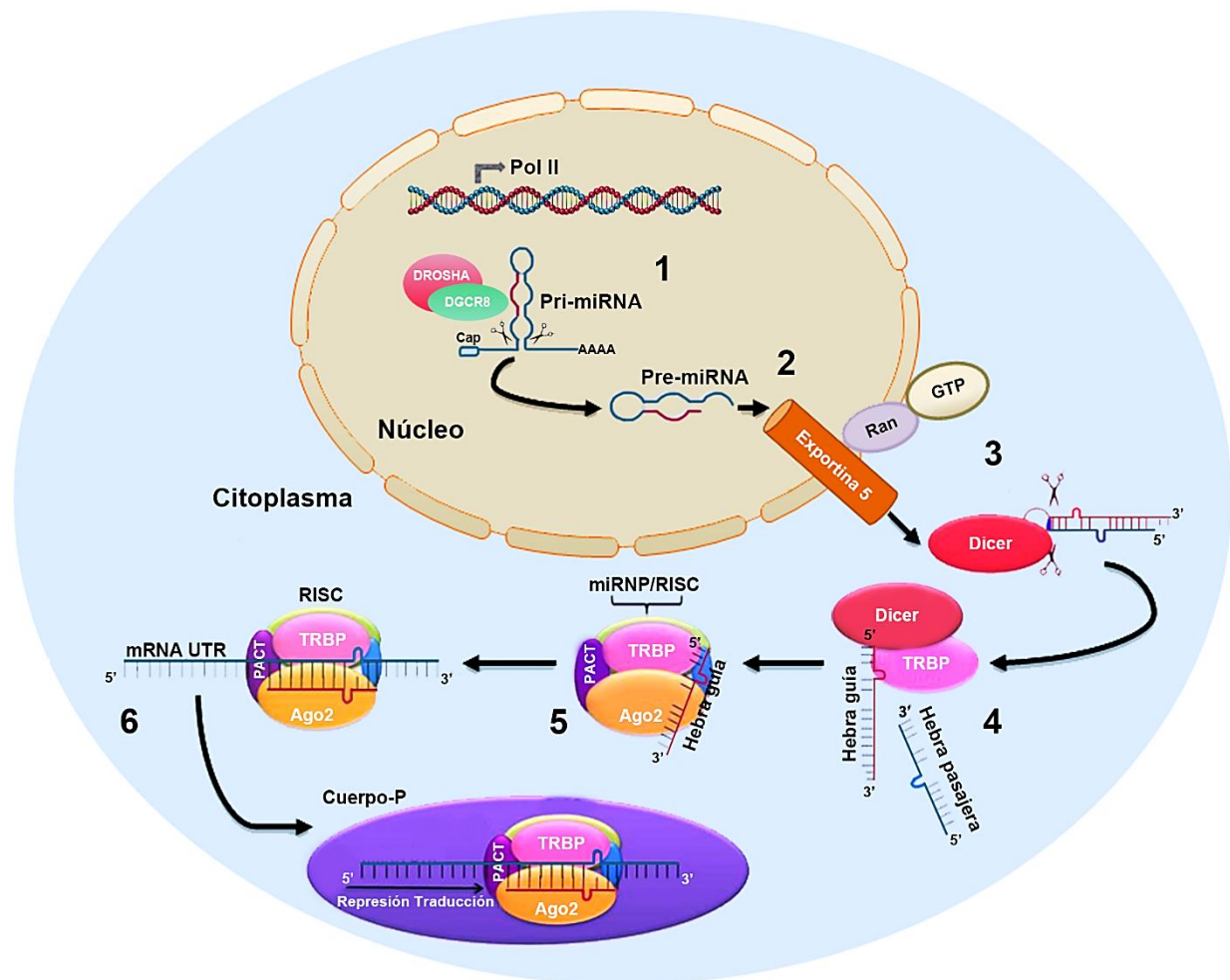


FIGURA 10. El procesamiento de los miRNAs clásico se inicia con la (1) transcripción del pri-miRNA mediante la RNA polimerasa II. (2) A continuación el transcrito primario es escindido en un pre-miRNA mediante el complejo formado por Drosha y DGCR8 (Microprocesador). (3) La siguiente etapa implica la exportación nuclear dependiente de RAN-GTP, mediante la Exportina-5. (4) Esta nueva localización permite a la RNasa Dicer y TRBP escindir el pre-miRNA, dando lugar a un duplex imperfecto de aproximadamente 19-24 nucleótidos de longitud, que se disociará en una hebra guía y otra pasajera. (5) Finalmente, la proteína argonauta-2 (Ago2), basándose en reglas termodinámicas seleccionará la hebra guía del miRNA, (6) constituyéndose el miRISC que se encarga de la regulación del mRNA diana.

1.9.2. Mecanismos de acción de los miRNAs

Los miRNAs pueden regular negativamente la expresión génica a través de 2 mecanismos principales que son la degradación del mRNA diana o la represión de la traducción, la utilización de un mecanismo u otro dependerá del mRNA diana. Una vez el miRNA se incorpore en el RISC, actuará un mecanismo u otro dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con su diana. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del mRNA (Bagga et al., 2005), mientras que si la complementariedad no es total o es insuficiente se producirá una inhibición de la traducción. Uno de los principales puntos de discusión en este campo gira en torno al grado de complementariedad necesario para el silenciamiento génico y a cuántos miRISC son necesarios para inhibir la traducción. Según los conocimientos disponibles sobre los siRNAs, se cree que serían necesarios al menos 11 pb para una elevada afinidad en el reconocimiento del mRNA diana y la unión al miRISC, por debajo de este número la afinidad del miRISC por su diana se encuentra comprometida. Sin embargo, Doench y Sharp (Doench y Sharp, 2004) describieron que la habilidad de los miRNAs para suprimir la traducción dependía enormemente de la energía libre de unión entre los primeros 8 nucleótidos del extremo 5'-UTR del miRNA y mRNA diana. Según esto un miRNA puede actuar sobre muchas zonas 3'-UTR de un gran número de genes. Estudios de expresión de microarrays mostraron que los miRNAs pueden inhibir muchos mRNAs dianas que contengan secuencias que sean complementarias a las posiciones 2-7 del extremo 5'-UTR de un miRNA, región que se conoce como secuencia semilla (*seed*) (Lim et al., 2005). La segunda cuestión podría responderse considerando la afinidad del miRISC por su diana; las evidencias apuntan a que se requieren varias regiones de unión a miRNAs para una interacción miRNA-mRNA de alta afinidad que suprima la traducción. Es plausible pensar que un miRISC que reconoce una unión imperfecta entre el miRNA y el mRNA con sólo 7-9 nucleótidos, se uniría a la diana con baja afinidad. Por lo que múltiples copias de miRISC podrían unirse a la diana para compensar la unión de baja afinidad entre el miRISC y el mRNA (Lim et al., 2005; Pillai et al., 2005).

Cuando un miRNA guía hacia la degradación de un mRNA, el corte se produce precisamente en el mismo sitio en que lo producen los siRNAs en su acción, entre los nucleótidos que rodean al residuo 10-11 del miRNA (Hutvagner y Zamore, 2002). Después de la degradación del mRNA, el miRNA permanece intacto y puede guiar hacia el reconocimiento y la destrucción de mRNAs adicionales. En general en este mecanismo de acción la complementariedad se puede dar tanto en regiones codificantes como en regiones 3'-UTR, mientras que cuando actúa inhibiendo la traducción suele unirse exclusivamente a la región 3'-UTR del mRNA. Existen excepciones como la que se ha observado con miR-122 que afecta positivamente la replicación del virus de la Hepatitis C, por unión a la región 5'-UTR no codificante (Jopling et al., 2005), en este caso el miRNA tiene función activadora de la expresión génica, aunque no está claro si es un mecanismo único o si representa un mecanismo de acción todavía desconocido de los miRNAs.

En el mecanismo de inhibición de la traducción, el principal efector es un miembro de la familia de RNA helicasas (**RCK/p54**) y componente del miRISC. Diversos estudios muestran que algunos componentes del miRISC colocalizan en los cuerpos-P (puntos citoplasmáticos que contienen complejos proteicos) junto con el mRNA reprimido traducionalmente. Múltiples copias del miRISC que contienen RCK/p54 pueden iniciar un evento de oligomerización que secuestra al mRNA y lo transporta a los cuerpos-P, una vez allí el mRNA traducionalmente reprimido podría permanecer en estructuras oligoméricas para su almacenamiento o podría formar un complejo con enzimas *decapping* y proteínas *cap-binding* que degradan el mRNA. En resumen, el miRNA en el miRISC indica la secuencia diana y RCK/p54 es la molécula efectora que transporta el mRNA hacia el almacenaje o procesamiento en los cuerpos-P (Sen y Blau, 2005; Liu et al., 2005; Valencia-Sanchez, 2006).

Por otro lado, algunos siRNAs pueden unirse al DNA y realizar no sólo represión post-transcripcional sino también represión transcripcional, esto apunta a que los miRNAs

podrían también actuar de esta manera. Además, los miRNAs podrían estar relacionados con la regulación de la estructura de la cromatina. En este sentido, la predicción de genes diana de los miRNAs entre los cuales hay proteínas modificadoras de histonas, como son las histonas metil-transferasas, proteínas de unión a islas CpG e histonas deacetilasas, apoyaría esta hipótesis (Lewis et al., 2005).

1.9.3. Los miRNAs y la autorrenovación de las CTEs

La decisión del estado de autorrenovación o diferenciación está regulada por un complejo conjunto de factores, incluyendo factores de transcripción, modificaciones de la cromatina, vías de señalización y ncRNAs. El programa molecular de las CTEs necesita ser conservado con el fin de mantener el estado de pluripotencia no diferenciado, mientras que este programa se verá sometido a cambios de expresión génica y la intervención de la epigenética, cuando las células están comprometidas hacia un proceso de diferenciación que resulta en una transformación masiva del fenotipo celular. Por su capacidad para regular de forma simultánea cientos de dianas, los miRNAs representan excelentes candidatos para esta rápida y gran transformación. En este sentido los miRNAs han demostrado ser piezas clave en la regulación del desarrollo de las células troncales al jugar un papel crítico en la formación y la definición de la pluripotencia de células troncales, así como en su diferenciación (Yi y Fuchs, 2011).

La expresión de los miRNAs se ha examinado ampliamente en las CTEs murinas y humanas mediante diversas técnicas revelando que la expresión global de los miRNAs es más baja en las CTEs en comparación a las mismas células diferenciadas. Sin embargo, algunos miRNAs están limitados a las CTEs, mientras que otros se encuentran ampliamente expresados, pero disminuyen significativamente durante la diferenciación. Por tanto, un número limitado de los miRNAs se transcriben en las CTEs y se expresan preferentemente en el estado pluripotente, mientras que serán inmediatamente silenciados una vez que reciben señales de diferenciación (Houbaviy et al., 2003). La

mayoría de estos miRNAs específicos se puede agrupar en 4 grandes grupos. Uno de ellos constituido por la familia miR-290 (miR-291, -294 y -295) en ratones y su homólogo en humanos la familia miR-371/373 (miR-371, -372 y -373); otro por la familia miR-302/367 (miR-302a/b/c/d y -367) común en ratones y humanos; la familia miR-17/92 (miR-17, -18a, -19a/b, -20a y -92); y la familia C19MC que incluye 46 miRNAs codificados en el cromosoma 19 (Stadler et al., 2010). La expresión común de similares miRNAs en CTEs murinas y humanas sugiere un importante papel funcional en la biología de las células troncales. La mayoría de estas familias de miRNAs se transcriben como transcritos policistrónicos, lo que sugiere que comparten reguladores comunes y el mismo patrón de expresión. De hecho, los promotores de la mayoría de estos miRNAs pueden ser activados por *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* (Marson et al., 2008). Además, presentan una secuencia semilla (*seed*) idéntica o muy similar (AAGUGCU o AAAGUGC), por lo que pueden dirigirse a un grupo común de mRNAs diana (Stadler et al., 2010).

El hecho de que muchos miRNAs tengan la misma secuencia semilla (*seed*) y que un solo miRNA puede actuar en múltiples dianas hacen difícil estudiar su función de forma individual. La eliminación de todos los miRNAs se puede conseguir mediante la supresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en el procesamiento o funcionamiento de los miRNAs, Drosha, Dicer o DGCR8, entre otros. La deficiencia de Dicer genera muerte prematura en etapas tempranas del desarrollo de ratones (Bernstein et al., 2003), mientras que las CTEs murinas mutantes en Dicer son viables en cultivo, pero presentan defectos en la diferenciación (Kanellopoulou et al., 2005). La pérdida de Dicer también conduce a graves defectos de crecimiento de las CTEs y prolonga ligeramente las fases G1 y G0 del ciclo celular (Murchison et al., 2005). De forma similar a la deficiencia de Dicer, la inactivación de DGCR8 da lugar a ratones no viables y las CTEs murinas con defectos en la proliferación y fallos en la diferenciación (Wang et al., 2008). Las deficiencias conjuntas de Drosha y Dicer atenúan drásticamente la división celular de las CTEs humanas e inducen defectos en la diferenciación (Qi et al.,

2009). En conjunto estos datos ponen en evidencia que los miRNAs son críticos para la autorrenovación y diferenciación de las CTEs.

Una regulación estricta de la división de células troncales es primordial para mantener la capacidad de autorrenovación. Los defectos observados en la proliferación de mutantes Dicer, Drosha y DGCR8 sugieren que los miRNAs están involucrados en la regulación de su ciclo celular. Se sabe que las CTEs se caracterizan por un atípico ciclo celular acelerado, debido a una corta transición de la fase G1 a la fase S en comparación a las células somáticas (Fluckiger et al., 2006; Wang et al., 2008). Los puntos de control regulan la progresión a través de las fases del ciclo celular y son regulados por la activación e inactivación secuencial de las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Contrariamente a las células somáticas, las CTEs expresan muy bajos niveles de inhibidores del ciclo celular (p21, p27 y p16), lo que hace que exhiban un atípico ciclo celular. Mucho de los defectos en la proliferación inducidos por la deficiencia de las enzimas Dicer o Drosha, pueden ser contrarrestados por miembros de las familias miR-290 y -302, lo que revela que se trata de miRNAs importantes como reguladores del ciclo celular (Wang et al., 2008; Sinkkonen et al., 2008). Por ello, a estos miRNAs se les conoce como específicos del ciclo celular de las CTEs (ESCC), dado que predominantemente intervienen en la regulación el ciclo celular (miRNAs promotores del ciclo celular de las CTEs). Este tipo de miRNAs comparten una secuencia semilla (*seed*) común, lo que sugiere que regulan un conjunto común de genes. La búsqueda de sus dianas reveló que funcionan mediante la supresión de varios reguladores clave (p21, Rbl2 y Last2) de puntos de restricción como la vía CiclinaE/CDK2, que regula la transición de las fases G1/S permitiendo así una rápida proliferación en las CTEs (Wang et al., 2008, 2013b). Interesantemente, la familia miR-290 en ratones ha sido mostrada como diana de Rbl2 y disminuye la expresión de las DNA metiltransferasas (Wang et al., 2008), de forma similar actúa su ortólogo en humanos la familia miR-372 (Qi et al., 2009). En conjunto, estos numerosos cambios moleculares inducidos sugieren que los miRNAs ESCC tienen un importante efecto promotor del ciclo celular y preservador de la

capacidad proliferativa, lo que les convierte en actores principales en el control de la división de las CTEs.

El circuito regulador básico (*OCT4-SOX2-NANOG*), desempeña un papel central en el mantenimiento y adquisición de la pluripotencia, aunque existen otros factores que participan también en la red reguladora de la pluripotencia como *LIN28*, *c-MYC*, *KLF4*, *TCF3* o *STAT3*. Se puede diferenciar un grupo de miRNAs característicos de las CTEs que son capaces de promover la autorrenovación de las células troncales y a su vez inhiben la diferenciación celular. Por ello, el impacto de los miRNAs sobre el transcriptoma de las CTEs ha sido analizado en profundidad. Se ha descubierto que los miRNAs parecen incrementar la actividad de *c-MYC* a través de múltiples rutas indirectas (Lin et al., 2009; Cartwright et al., 2005). Este factor promueve la proliferación y es requerido para la autorrenovación de las CTEs y su inhibición promueve la pérdida de la autorrenovación (Singh y Dalton, 2009). Además, *c-MYC* conduce a la transcripción de numerosos miRNAs que promueven la autorrenovación como son miR-141, -200 y -429 (Lin et al., 2009). Interesantemente, los promotores de las familias miR-290 y -302 son directamente regulados por los factores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *TCF3*) y a su vez los miRNAs mantienen la expresión de los factores de pluripotencia mediante la inhibición de silenciadores (Judson et al., 2009; Marson et al., 2008). Otros factores asociados a la pluripotencia son también indirectamente promovidos por los miRNAs, estos incluyen *LIN28*, *TRIM71* y *SALL4* (Melton et al., 2010) o bien son los miRNAs los que promueven su expresión como la familia miR-17/92 que induce a *LIN28* (Warrander et al., 2016). Por tanto, parece claro que se establecen circuitos de retroalimentación entre los factores de transcripción y los miRNAs que ayuda a fortalecer el mantenimiento del estado pluripotente de las CTEs.

1.9.4. Los miRNAs y la diferenciación celular de las CTEs

La transición del estado de autorrenovación de las CTEs a un estado diferenciado es un proceso robustamente regulado para un desarrollo normal y la homeostasis de los tejidos. Dado que los miRNAs se adaptan para estabilizar el estado de autorrenovación, están bien situados para promover la transición de la autorrenovación a la diferenciación. Los miRNAs pro-diferenciación pueden ser inducidos rápidamente con el inicio de los procesos de diferenciación de las CTEs a linajes específicos y silencian la autorrenovación actuando directamente sobre la red central de factores de pluripotencia. Una segunda clase de miRNAs pro-diferenciación van siendo inducidos durante el transcurso de la diferenciación y en general suprime programas génicos asociados a las CTEs pero no a los mismos factores de transcripción centrales de pluripotencia (Tiscornia y Izpisua Belmonte, 2010). Estas 2 clases de miRNAs de diferenciación probablemente juegan distintos roles en el proceso de diferenciación, de modo que la primera clase de miRNAs suprimen directamente el estado de autorrenovación de las CTEs, mientras que la segunda clase de miRNAs predominantemente estabilizan el estado diferenciado, al igual que los miRNAs ESCC estabilizan el estado pluripotencial de las CTEs (Ong et al., 2015).

Durante la diferenciación de las CTEs humanas es sobreexpresado miR-145 (Stadler et al., 2010), este incremento reprime la expresión de factores de pluripotencia y facilita la diferenciación, mientras que su disminución perjudica a la diferenciación e induce la expresión de *OCT4*, *SOX2* y *KLF4*. Por tanto, miR-145 controla la diferenciación de las CTEs mediante la interacción con los factores de pluripotencia silenciando el programa de autorrenovación (Xu et al., 2009). Interesantemente, el promotor de miR-145 es inhibido por *OCT4* estableciéndose un circuito de retroalimentación negativo. En las CTEs murinas se ha demostrado que varios miRNAs promueven la diferenciación mediante interacción con genes que codifican factores de transcripción implicados en el mantenimiento de la identidad de células troncales. Los miRNAs miR-200c, -203 y -183

cooperan para reprimir *SOX2* y *KLF4* (Wellner et al., 2009). Por otra parte, los miRNAs miR-134, -296 y -470, sobreexpresados durante la diferenciación inducida por el ácido retinoico que induce una diferenciación preponderantemente neural, constituyen además represores directos de *NANOG*, *OCT4* y *SOX2* en las CTEs (Tay et al., 2008a; b). Recientemente, se ha demostrado que miR-125 y la familia miR-181 facilita la diferenciación de las CTEs murinas mediante la represión de *Cbx7*, un componente crucial para el mantenimiento de la autorrenovación y el estado pluripotente (O’Loghlen et al., 2012). Por tanto, todos estos miRNAs pueden estar implicados en la diferenciación hacia distintos linajes a través del silenciamiento de la autorrenovación de las CTEs.

En contraste a los miRNAs que directamente reprimen la autorrenovación de las CTEs, otro grupo de miRNAs desempeñan un papel crucial en el compromiso del linaje y la estabilización del estado diferenciado. En este sentido, miR-16 y -191 altamente expresados en las CTEs murinas, interaccionan directamente con *Smad2*, un importante mediador de la señalización Activina/Nodal dando lugar a la inhibición del linaje mesendodérmico (Hadjimichael et al., 2016). Otro miRNA expresado en estado no diferenciado como es miR-23a, inhibe la diferenciación endodérmica y ectodérmica (Hadjimichael et al., 2016). La familia de miRNAs let-7 descubierta en *C. elegans*, constituyen importantes estabilizadores del destino celular diferenciado (Reinhart et al., 2000; Nimmo y Slack, 2009; Melton et al., 2010). En ratones y humanos hay 9 miembros distintos de la familia let-7 con un patrón de expresión variable específico de tejido (Lee et al., 2016). El pri-let-7 es transcrito en las CTEs y dará lugar a un pre-let-7 en el citoplasma, sin embargo el let-7 maduro no se detecta en las CTEs no diferenciadas, mientras que es altamente expresado en las células somáticas diferenciadas. En las CTEs existe un mecanismo que permite el silenciamiento post-transcripcional de transcritos de la familia let-7, un complejo de RNA unido a la proteína LIN28, la terminal uridil-transferasa y TUT4, se unen para inducir la degradación de los transcritos pre-let-7 (Hagan et al., 2009; Heo et al., 2008, 2009; Rybak et al., 2008). Sin embargo, la expresión

de *LIN28* es rápidamente inhibida durante la diferenciación de las CTEs, lo que permite un rápido incremento de la expresión de los miembros de la familia let-7 (Rybak et al., 2008). Recientemente, se ha demostrado que esta familia constituye un importante grupo de miRNAs pro-diferenciación que controla estrechamente el nivel de los factores de pluripotencia (Melton et al., 2010).

Un estudio reveló que la familia let-7 puede reprimir el programa de pluripotencia de las CTEs murinas (Melton et al., 2010). La reincorporación de los miembros de la familia let-7 en las CTEs mutantes para DCGR8 puede rescatar los defectos en la diferenciación observados al interaccionar con factores de pluripotencia como *c-MYC*, *LIN28* y *SALL4*. Sin embargo, los miembros de esta familia no tienen efecto cuando son incorporados junto con los miRNAs ESCC. Esta observación sugiere que los miRNAs ESCC que predominan en las CTEs en estado no diferenciado son capaces de prevenir la pérdida de autorrenovación inducida por los miRNAs de la familia let-7. Se ha propuesto un modelo de acción en el que la familia let-7 y los miRNAs ESCC funcionan antagónicamente sobre la autorrenovación. Por un lado, la familia let-7 reprime a los factores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *TCF3*), que a su vez son indirectamente activados por los miRNAs ESCC a través de dianas desconocidas. Este mecanismo antagónico sugiere que existe una red de regulación en la que la familia let-7 y los miRNAs ESCC tienen función y expresión mutuamente excluyente. Así, en un estado no diferenciado los factores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) de las CTEs promueven a los miRNAs ESCC, inductores de la expresión de *LIN28*, *c-MYC* y otros factores que inhiben la maduración de la familia let-7 y como resultado se induce la autorrenovación. Sin embargo, la diferenciación de las CTEs viene acompañada de una disminución de los factores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) y con ello de los miRNAs ESCC y a su vez los factores de inhibición, de forma que en este estado diferenciado los miRNAs let-7 ya no son inhibidos. Por tanto, la familia let-7 ahora estabiliza el estado diferenciado controlando la expresión de los factores requeridos para el destino de las CTEs.

Los miRNAs de la familia let-7 además de suprimir el programa transcripcional de las CTEs también promueven el ciclo celular, para lo cual podrán asociarse de forma directa e indirecta a múltiples activadores de la transición G1/S (Cdc25a, Cdk6, ciclinaD1 y ciclinaD2) (Johnson et al., 2007; Kumar et al., 2008; Schultz et al., 2008). Estas interacciones y otras contribuyen al efecto general de la familia let-7 incrementando el número de células en fase G1 del ciclo celular (Melton et al., 2010; Singh y Dalton, 2009), lo que sugiere que la autorrenovación influye en el ciclo celular característico de las CTEs y se ha postulado que las células en fase G1 son más susceptibles a la cascada de señalización pro-diferenciación, incluyendo la señalización MAPK (Burdon et al., 2002).

Por tanto, los miRNAs regulan la autorrenovación de las CTEs y el compromiso de linaje, como ocurren en el caso de miR-145, -200 o la familia let-7, ya sea promoviendo la salida de la autorrenovación y el compromiso con linajes específicos o mediante la inhibición de los distintos procesos de diferenciación. Además, es posible también que los miRNAs impulsen el compromiso hacia linajes específicos o tipos celulares diferenciados, como por ejemplo miR-133 y -1 esenciales para la diferenciación de las CTEs hacia cardiomiocitos (Takaya et al., 2009) o miR-9 que promueve la diferenciación hacia progenitores neuronales (Zhao et al., 2009). Sin embargo, la identificación y la comprensión de las funciones, y contribución de los miRNAs en la diferenciación constituye un área aún por explorar.

1.9.5. Uso de los miRNAs en la reprogramación celular

Un gran avance en el campo de la investigación de células troncales se logró cuando el grupo de Yamanaka mostró que es posible reprogramar fibroblastos de embriones murinos en células pluripotentes a las que se denominó células iPS (iPSCs), mediante la expresión ectópica de los 4 factores *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC* (OSKM, factores Yamanaka) (Takahashi y Yamanaka, 2006). La omisión del oncogen *c-MYC* de ese cóctel

todavía resulta en la formación de colonias de iPSCs, aunque con una menor eficiencia. Este resultado se ha repetido por varios grupos en muestras humanas para reprogramar diversos tipos de células de diferentes tejidos (Takahashi et al., 2007; Park et al., 2008; Wu y Hochedlinger, 2011). Además de los factores de Yamanaka, otro conjunto de 4 factores que incluye a *OCT4*, *SOX2*, *LIN28* y *NANOG* (OSLN, factores de Thomson) (Yu et al., 2007), puede inducir también la generación de las iPSCs. Sin embargo, a pesar de los grandes esfuerzos para determinar los mecanismos moleculares que subyacen a los acontecimientos de la reprogramación siguen siendo desconocidos, aunque se ha visto que implica la reactivación endógena de genes de pluripotencia, remodelación de la cromatina y cambios morfológicos hacia un fenotipo epitelial. Un creciente número de estudios señalan un papel importante en la reprogramación de los miRNAs algo que no es muy sorprendente ya que como se mencionó anteriormente, los miRNAs son críticos para el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación de las CTEs. La monitorización de la generación de las iPSCs a partir de fibroblastos humanos utilizando vectores marcadores de los miRNAs muestra que las familias miR-302 y -17, especialmente abundantes en las CTEs, se expresan durante la primera etapa de la reprogramación inducida por los factores OSKM (Kamata et al., 2010; Li et al., 2011). Esto era de esperar ya que *OCT4* y *SOX2*, factores de transcripción utilizados para inducir la reprogramación, puede activar los promotores de las familias miR-302 y -106 (Marson et al., 2008; Tiscornia y Izpisua Belmonte, 2010). Además, las iPSCs totalmente reprogramadas presentan un perfil de miRNA muy similar al de las CTEs. Por otro lado, la alteración del procesamiento de los miRNAs o su función por inactivación de Dicer o Ago2 reduce drásticamente el número de colonias de iPSCs inducidas por los factores OSKM u OSK en fibroblastos embrionarios murinos. Por tanto, todo ello sugiere que algunos miRNAs son esenciales para la reprogramación (Li et al., 2011).

Varias familias de miRNAs enriquecidas en las CTEs se identificaron como posibles potenciadores de la reprogramación. Un subconjunto de los miRNAs pertenecientes a la familia miR-290 (miR-291, -294 y -295), parece sustituir a la contribución de c-Myc

durante la reprogramación de fibroblastos de embriones murinos y es capaz de mejorar significativamente el número de colonias de iPSCs (Judson et al., 2009). Posteriormente se propuso que miR-93 y miR-106b son reguladores clave de la actividad de reprogramación, potenciando la inducción de las iPSCs con factores OSKM y OSLN. Resultados similares de potenciación se dieron con miembros de las familias miR-302 y -200 (Liao et al., 2011; Pfaff et al., 2011; Judson et al., 2009; Subramanyam et al., 2011), estos miRNAs parecen actuar a nivel del ciclo celular, modificaciones epigenéticas y la transición epitelio-mesénquima.

Recientemente, grupos de trabajo independientes han demostrado de forma convincente que las iPSCs humanas y murinas se pueden derivar a partir de fibroblastos sin el requisito de factores de transcripción exógenos mediante la adición de los miRNAs de la familia miR-302/367 con gran rapidez y eficiencia (Anokye-Danso et al., 2011), una mejora del proceso de reprogramación celular debido posiblemente a la propia naturaleza de los miRNAs, ya que un solo miRNA puede interaccionar con cientos de mRNAs simultáneamente, lo que permite controlar diversas rutas implicadas en la reprogramación y se ha denominado a las células obtenidas miR-iPS. Estudios posteriores han utilizado diferentes combinaciones de miRNAs pero siempre con la familia miR-302 como protagonista, obteniendo resultados similares (Miyoshi et al., 2010). Estos resultados confirman que es posible obtener las iPSCs con miRNAs sin la necesidad de integrar un material genético exógeno y que la familia miR-302 se presenta como la familia de miRNAs más importante en la reprogramación de células humanas. Estudios posteriores determinarán la combinación de miRNAs maduros idónea y el papel de cada miRNA en la obtención de las iPSCs. Todo ello, permitiría determinar el mejor cóctel y el momento concreto de introducción de los miRNAs con el fin de alcanzar la máxima eficiencia, tanto para este como para otros mecanismos y procesos celulares.

En los últimos 10 años, los miRNAs han experimentado un cambio radical en la mente de la gente, de ser considerados inicialmente como un RNA basura que no era útil para el individuo, ahora aparecen como reguladores críticos de la mayoría de los eventos celulares gracias a su capacidad de dirigirse a cientos de mRNAs diana que les permite inducir un cambio rápido en el destino celular y afinar la expresión del genoma.

Hemos visto como los miRNAs son componentes esenciales en el control del ciclo celular abreviado de las células troncales y por lo tanto están implicados en la proliferación y su capacidad de autorrenovación. También regulan la diferenciación y desdiferenciación de las células determinando el destino celular. Por tanto, los miRNAs presentan un gran potencial en medicina regenerativa y terapia del cáncer. Estas pequeñas moléculas reguladoras pueden ser utilizadas para generar eficientemente células iPS sin integración del DNA de células de pacientes con el fin de elaborar modelos de enfermedades y obtener un reservorio celular. También proporcionan una nueva estrategia para la modificación previa de las células troncales antes de la terapia de trasplante, diferenciando las células pluripotentes en células de linajes particulares con potencial para la terapia celular. La comprensión completa de las funciones de los miRNAs en la diferenciación y el destino de las células troncales será esencial para aprovechar a los miRNAs como prometedoras herramientas terapéuticas en el futuro.

2. OBJETIVOS

Nuestro grupo fue pionero en demostrar que las CTEs murinas pueden diferenciarse *in vitro* hacia células productoras de insulina y revertir *in vivo* la glucemia en modelos murinos diabéticos, estudios posteriores han demostrado que los protocolos de diferenciación *in vitro* pueden ser optimizados para aumentar la eficacia y eficiencia, consiguiendo células productoras de insulina maduras funcionales en cantidad suficiente para una posible terapia celular. Durante el desarrollo un complejo entramado de señales inductoras y de factores de transcripción reguladores determina de forma combinatoria la adquisición de un fenotipo pancreático. Nuestra **hipótesis** consistía en comprobar si es posible aumentar la eficacia y eficiencia del proceso de diferenciación de las células pluripotentes hacia células productoras de insulina, mediante un mecanismo regulador innovador ejercido por pequeñas moléculas de ncRNAs como son los miRNAs, de forma que podrán constituir herramientas moleculares útiles en la manipulación de las CTEs.

El **objetivo principal** se centra especialmente en el aislamiento de miRNAs candidatos e involucrados en la diferenciación de células troncales pluripotentes a células productoras de insulina, analizando el posible patrón de expresión común de miRNAs durante el desarrollo embrionario pancreático y la diferenciación de las CTEs hacia células productoras de insulina e identificar específicos miRNAs candidatos que puedan desempeñar un papel regulador clave en la diferenciación de las CTEs, así como analizar el patrón de expresión de miRNAs en las células maduras de islotes pancreáticos adultos y con este propósito nos hemos planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar el posible efecto de las pequeñas moléculas de ncRNAs en los procesos de diferenciación *in vitro* de las CTEs.
2. Analizar la expresión global de los miRNAs durante el proceso de diferenciación *in vitro* de las CTEs hacia células humanas productoras de insulina, mediante microarrays para la identificación de miRNAs específicos implicados en el proceso de diferenciación.

3. Analizar el patrón de expresión de los miRNAs en el tejido pancreático adulto e identificar aquellos preferentemente expresados en las células de islotes pancreáticos adultos.
4. Estudiar los perfiles de expresión común a los miRNAs descritos en la organogénesis del páncreas y la diferenciación de las CTEs hacia células productoras de insulina, determinando los mecanismos compartidos en la regulación mediada por estos miRNAs y comprobar si la regulación tiene lugar a través de las mismas proteínas diana.
5. Estudiar el efecto de la inhibición o sobreexpresión de los miRNAs identificados con una expresión preferente tanto en el proceso de diferenciación pancreática como en los islotes pancreáticos adultos. Analizando la implicación funcional de los miRNAs validados y seleccionados en la diferenciación *in vitro* de las CTEs hacia células productoras de insulina y la implicación de estos miRNAs en la inducción de cambios de expresión de los marcadores de diferenciación pancreática.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Bioética y experimentación animal

Se emplearon ratones adultos C57BL/6J como modelo de experimentación y fueron alojados en la Unidad de Recursos Biológicos del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Los protocolos de manipulación de animales, incluyendo eutanasia y sacrificio, se realizaron bajo la guía de legislación de la Comunidad Europea y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CABIMER (CEEA-CABIMER. 19/2010).

3.1.1. Obtención de muestras biológicas a partir de tejidos de origen murino

Los animales adultos de 3 meses se sacrificaron mediante dislocación cervical, para la obtención de los islotes pancreáticos. Una vez sacrificados se practica una laparotomía media completa, abatiendo la pared abdominal lateralmente mediante 2 secciones horizontales inmediatamente por debajo de los rebordes costales inferiores. Se movilizaron el hígado y se fijó la pared costal mediante un papel de filtro. Se desplazaron los intestinos a partir del yeyuno hacia la derecha del animal, de forma que quedaron expuestos el páncreas, la vesícula biliar y la porción proximal del conducto biliar común. Se movilizó el duodeno con el fin de localizar la porción distal del conducto biliar común y se ligó el colédoco en su unión al duodeno, a unos 2 o 3 milímetros por debajo de la vesícula biliar, se introdujo en el conducto biliar una aguja de punta roma, previamente doblada en ángulo recto; a continuación, se pasó una ligadura que fija la aguja en su posición. Se inyectó con una jeringa 6 mL de solución de Hanks (Gibco, 14025092), suplementada con 0,08 mg/mL de collagenasa (SIGMA, C9263). De este modo, se logra una buena distensión del tejido pancreático que facilita su extracción, además de permitir un buen acceso de la collagenasa a todo el páncreas. Se extrajo el páncreas de la cavidad abdominal por disección y se transfirió a un tubo de ensayo de 15 mL, que se incubó en un baño termostatzado a 37°C durante 10 minutos, agitando enérgicamente a los 5 y 10 minutos. El tejido pancreático en digestión se detuvo

mediante la adición de solución de Hanks a 4°C. A partir de este momento comienza la primera fase de lavado; el digerido se agitó suavemente con una pipeta, para disgregar y resuspender el tejido, después se sedimentó mediante centrifugación a 1.200 revoluciones por minuto (rpm) durante 2 minutos y por último se decantó el líquido sobrante, dejando solo el sedimento de tejido. Este proceso se repite 2 veces con el fin de eliminar la colagenasa del medio. A partir del tejido pancreático digerido final se recuperan los islotes pancreáticos individualmente, mediante succión con pipeta automática con la finalidad de separar bien los islotes pancreáticos del resto de tejido exocrino. Los islotes pancreáticos fueron entonces almacenados a -80°C hasta ser sometidos al proceso de extracción del RNA.

3.2. Cultivo Celular

3.2.1. Líneas celulares cultivadas y condiciones de cultivo

Las distintas líneas celulares utilizadas incluyen CTEs de origen murino (ES-D3) y humano (HS181), una línea celular de iPSC de origen humano (MSUH-001) y una línea derivada a partir de células beta pancreáticas murinas de origen tumoral (INS-1E):

- **ES-D3:** Línea de CTEs murinas comercial (ATCC®; CRL-1934™), derivadas de la masa celular interna de blastocisto de ratón 129S2/SvPas (RF32835) y generadas por el grupo de Doetschman (Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft Institute, Alemania) (Doetschman et al., 1985). Las células ES-D3 no necesitan ser cultivadas sobre una capa de células nodrizas o matriz proteica, sino que para el mantenimiento de su estado pluripotencial no diferenciado es suficiente la adición en el medio de cultivo del LIF, facilitando algunos abordajes experimentales (p. ej. transfección). Las células fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM GlutaMAX™ (Gibco, 32430) con 15% de suero fetal bovino inactivado (FBS Lonza, DE14-801F), suplementado con penicilina 100 U/mL y

estreptomicina 100 µg/mL (Gibco, 15140), aminoácidos no esenciales 2mM (Invitrogen, 25030-024), 2-mercaptoetanol 0,1 mM (Invitrogen, 31350-010) y LIF 10⁶ U/mL (Millipore, ESG1107) e incubadas a 37°C y 5% de CO₂.

- **HS181:** Línea de CTEs humana cedida por parte de Hovatta, derivada en la Unidad de Fertilidad del Hospital Universitario Karolinska, después de la aprobación por el Consejo ético de investigación del Instituto Karolinska, Drno 454/02. Esta línea se derivó de un embrión que no podría ser utilizado para el tratamiento de la infertilidad de una pareja, previo consentimiento informado para la donación del embrión con el fin de derivar una posible línea de CTEs permanente para ser utilizado en investigación. La línea HS181 está incluida en el registro de la Unión Europea hESC (<http://www.hescereg.eu/>). A diferencia de las CTEs de origen murino, las CTEs humanas deben cultivarse sobre un sustrato celular o bien una matriz proteica junto con el hrbFGF para mantener su estado de pluripotencia, lo que permite que las células crezcan formando colonias de bordes bien definidos y mantengan su estado no diferenciado. Las células fueron cultivadas según lo descrito en el trabajo de Hovatta (Hovatta et al., 2003). Las placas de cultivo fueron tratadas con matrigel (1:60) y las células fueron mantenidas con medio de cultivo condicionado obtenido a partir de una línea de fibroblastos humanos fetales comercial (ATCC® CRL-2429) que previamente habían sido inactivados con mitomicina C (10 µg/mL) durante 3h a 37 °C. El medio condicionado obtenido a partir del cultivo de fibroblastos fetales inactivados (ATCC®; CRL-2429™) que liberan al medio FGF, está constituido por medio de cultivo DMEM KnockOut™(Gibco, 10829-018) con 20% de reemplazante de suero (Gibco, 10828-028), L-Glutamina 2 mM (Gibco, 25030-032), aminoácidos no esenciales 2mM (Gibco, 11140-035), penicilina 50 U/mL y estreptomicina 50 µg/mL (Gibco, 15140-122), 2-Mercaptoethanol 0,1 mM (Gibco, 31350-010) y al que posteriormente se le suplementó con hrbFGF 8 ng/mL (R&D System, 234-FSE), para mantener las células HS181 que son incubadas a 37°C y 5% de CO₂.

- **MSUH-001:** Línea de iPSCs obtenida en el Biobanco del ISCIII (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad). Estas células fueron cultivadas según lo descrito para las células HS181.
- **INS-1E:** Línea celular derivada de un insulinoma de rata inducido por irradiación de rayos X por el grupo de Volheim en la Universidad de Ginebra, Suiza (Asfari et al., 1992), que más tarde conseguirían aislar células INS-1E clonales de las células parentales (Merglen et al., 2004), fueron generosamente cedidas por F.J Bedoya (CABIMER Sevilla, España). Estas células presentan la ventaja de un fenotipo celular diferenciado beta estable en 116 pases y son capaces de secretar insulina en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa, con una respuesta similar a la de los islotes pancreáticos de rata (Merglen et al., 2004). Esta línea fue utilizada para las pruebas de optimización del análisis funcional con miRNAs. Las células INS-1E fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco, 61870) con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS: Lonza, DE14-801F) y suplementadas con HEPES 10 mM (Gibco, 15630-056), piruvato 1 mM (Gibco, 11360-039), 2-mercaptoetanol 0,02 mM (Invitrogen, 31350-010), penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL (Gibco) e incubadas a 37°C y 5% de CO₂.

3.2.2. Protocolo de diferenciación celular

Las líneas celulares pluripotentes fueron mantenidas en cultivo en condiciones de no diferenciación como se ha descrito previamente y fueron inducidas a diferenciarse mediante un protocolo de diferenciación diferente para células de origen murino y humano.

- **Diferenciación de CTEs murinas:** El proceso de diferenciación dirigida se inicia con la formación de EBs a partir de una suspensión de células no diferenciadas (1.000 células/µL), mediante la técnica de gota colgante que consiste en cultivar células con medio de cultivo DMEM GlutaMAX™ (Gibco, 32430), suplementado con penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL (Gibco, 15140), 2 mM

aminoácidos no esenciales (Invitrogen, 25030-024) y 2-mercaptoetanol 0,1 mM (Invitrogen, 31350-010), retirando el LIF y formando gotas de 30 μ L, que se dejan suspendidas sobre la tapa de una placa de Petri e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 días, lo que impide la adhesión de las células a la placa y les permite en cambio agregarse entre sí para formar los EBs, con una estructura tridimensional simulando el proceso del desarrollo embrionario para la formación de tejidos de las principales capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Después de este proceso los EBs fueron recolectados y separados de células muertas que quedan en el sobrenadante mediante centrifugación durante 5 minutos a 800 rpm y los EBs se sembraron en placas adherentes previamente tratadas con gelatina. Después, fueron cultivados en adherencia con **medio de diferenciación pancreático-I** constituido por DMEM GlutaMAX™ (Gibco, 32430) con 5% de suero fetal bovino inactivado (FBS: Lonza, DE14-801F), suplementado con penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 μ g/mL (Gibco, 15140), aminoácidos no esenciales 2 mM (Invitrogen, 25030-024) y 2-mercaptoetanol 0,1 mM (Invitrogen, 31350-010) y **medio de diferenciación pancreático-II** constituido por DMEM/F12 GlutaMAX™ (Gibco, 10565-018), suplementado con penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 μ g/mL (Gibco, 15140). El primer día el medio de diferenciación-I fue suplementado con activina A 100 ng/mL (R&D Systems, 338-AC) y el segundo día se añadió al medio el ácido retinoico 1 μ M (Sigma, R2625) para inducir la formación del endodermo definitivo. Durante los siguientes 4 días el medio fue suplementado con el hrbFGF 10 ng/mL (R&D Systems, 234-FSE) para inducir el endodermo pancreático. Por último, para expandir los precursores de las células productoras de insulina y conseguir su maduración, las células fueron cultivadas con medio de diferenciación pancreático-II suplementado con los factores hrbFGF 10 ng/mL (R&D Systems, 234-FSE), laminina 1 μ g/mL (Sigma, L2020) y nicotinamida 10 mM (Sigma, N0636) y los suplementos N2 (Gibco, 17502-048) y

B27 (Gibco, 17504-044), durante los últimos 4 días del protocolo de diferenciación.

- **Diferenciación de CTEs e iPSCs humanas:** El proceso de diferenciación dirigida se llevó a cabo mediante un protocolo de diferenciación establecido en nuestro laboratorio de aquí en adelante **protocolo CABIMER** (Pezzolla et al., 2015). Para ello, ambas líneas celulares fueron sembradas en placas previamente tratadas con matrigel a una densidad de 2.500 células/cm², que fueron mantenidas en cultivo con medio de no diferenciación hasta conseguir un 80% de confluencia durante 8-10 días. El **medio de diferenciación-I** constituido por RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco, 61870) con concentraciones crecientes de 0 a 2% de FBS (Lonza, DE14-801F), suplementado con Penicilina 50 U/mL y estreptomicina 50 µg/mL (Gibco, 15140) y el **medio de diferenciación-II** está constituido por DMEM KnockOut™ (Gibco, 10829-018) con reemplazante de suero 12% (Gibco, 10828-028), suplementado con L-Glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,2 mM (Invitrogen, 25030-024), penicilina 50 U/mL y estreptomicina 50 µg/mL (Gibco, 15140) y 2-mercaptoethanol 0,1 mM (Invitrogen, 31350-010) para la maduración de los islotes pancreáticos. Brevemente, para inducir el mesendodermo se utilizó el primer día el **medio de diferenciación-I** suplementado con activina A 100 ng/mL (R&D Systems, 338-AC) y Wnt3a 25 ng/mL (R&D Systems, 1324-WN); el segundo día se retiró el factor Wnt3a y el medio fue suplementado con un 0,2% de FBS y desde el tercer día en adelante se utilizó el mismo medio añadiendo FBS 2%. La activina A fue añadida diariamente durante los primeros 5 días para la obtención del endodermo definitivo. Para inducir el endodermo pancreático, se añadieron al medio de cultivo el ácido retinoico 2 µM (Sigma, R2625) y el hrbFGF 64 ng/mL (R&D Systems, 234-FSE) durante 3 días. Para enriquecer el endodermo pancreático a expensas de otros derivados endodérmicos se añadió al medio de cultivo la nogina 50 ng/mL (R&D Systems, 6057-NG) durante 3 días y después ciclopamina 0,25 µM (Calbiochem, 239804) durante los siguientes 3 días. En este

punto de la diferenciación las células fueron disociadas mecánicamente para pasar de un cultivo en adherencia a un cultivo en suspensión necesario para promover la agrupación de las células en estructuras tridimensionales o *clusters* similares a los de los islotes pancreáticos. Para el cultivo en suspensión se utilizó el **medio de diferenciación-II** suplementado con fibronectina 5 µg/mL (Sigma, F0895) y una mezcla de insulina 0,85 mM, transferrina 0,035 mM y selenio 0,02 mM (ITS; Gibco, 51300) durante 8 días. Finalmente, para incrementar la maduración de las células beta pancreáticas se añadió al mismo medio de cultivo el resveratrol 75 µM (Sigma, R5010) durante los 2 últimos días de diferenciación.

3.3. Análisis Funcional de los miRNAs

3.3.1. Obtención de los miRNAs: *Pool* de miRNAs y miRNAs sintéticos

El aislamiento de aquellos miRNAs endógenos específicos de un tejido o tipo celular concreto, de aquí en adelante “*pool*”, se lleva a cabo mediante un kit comercial (mirVana™ miRNA Isolation Kit Thermo Fisher Scientific, AM1560), que combina las ventajas de la extracción orgánica y fase sólida, evitando las desventajas de ambos. Utilizando este eficaz método basado en un filtro de fibra de vidrio (GFF) y consistente en filtrados secuenciales con diferente concentración de etanol 25 y 55%, con lo que se obtiene una fracción de RNA altamente enriquecida en especies de RNA de tamaño inferior a 200 nucleótidos.

Siguiendo las indicaciones del kit de extracción, la disrupción de la muestra se lleva a cabo en una solución de lisis desnaturizante. A continuación la muestra es sometida a una extracción en ácido fenol-cloroformo (5:1) para su purificación, obteniéndose el RNA y eliminando la mayoría del DNA (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para el aislamiento de RNA altamente enriquecido en pequeños RNAs, se añadió etanol 100% hasta llevar las muestras a una concentración final de etanol 25%. Cuando esta mezcla de lisado con

el etanol fue filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio, los grandes RNAs fueron inmovilizados y los pequeños RNAs recogidos en el filtrado. A continuación, la concentración del etanol se incrementó hasta el 55% y la mezcla fue filtrada a través de un segundo filtro de fibra de vidrio donde los pequeños RNAs fueron inmovilizados. Finalmente, este RNA fue lavado varias veces con solución de lavado, eluido en agua grado biología molecular libre de RNasas, DNasas y proteasas (5PRIME, 2500010) y almacenado a -80°C.

Por otra parte, se pueden obtener comercialmente pequeños RNAs sintetizados químicamente que mimetizan con los miRNAs endógenos, denominados mimic-miR o bien pequeñas moléculas de RNA de cadena sencilla químicamente modificadas y diseñadas específicamente para unirse a los miRNAs endógenos inhibiéndolos, denominados anti-miR. Ambos permitirán el análisis funcional de los miRNAs mediante la sobreexpresión o inhibición de su actividad respectivamente. Para este estudio hemos analizado individualmente la función de los siguientes miRNAs (**Tabla 3**):

miRBase ID	NºAcceso miRBase	Secuencia de los miRNAs Madura
hsa-miR-7-5p	MIMAT0000252	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU
hsa-miR-375	MIMAT0000728	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
miR-148a-3p	MIMAT0000243	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU

TABLA 3. Secuencia de los miRNAs maduros y acceso en la miRBase.

3.3.2. Transfección de los miRNAs

El mecanismo de transfección de las pequeñas moléculas de RNA tiene lugar mediante lipofección, proceso basado en una neutralización de cargas entre los lípidos catiónicos y los miRNAs polianiónicos, formándose complejos compactos, que serán transportados al interior de las células. Este complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del complejo en el citosol mediante endocitosis (entrada *flip-flap*), siendo liberados al citoplasma desde los liposomas. Existe un gran número de lípidos que se emplean en lipofección, aunque en todas ellos existe una estructura consenso de un lípido catiónico sintético, a partir de la cual se han diseñado formulaciones optimizadas

para pequeñas moléculas de RNA mejorando la absorción efectiva. En nuestro estudio utilizamos el agente de transfección DharmaFECT1 (Dharmacon, T-2001-02).

El proceso de transfección se inicia con la disociación de las células mediante métodos enzimáticos o mecánicos. A continuación, las células fueron diluidas en 1,6 mL de medio completo de cultivo (medio en el que son mantenidas las células), transfiriendo la suspensión celular a placas multipocillo e incubando bajo las condiciones de crecimiento normales hasta la adición de los complejos de transfección (37°C y 5% de CO₂). Para formar los complejos en tubos separados, se preparó el miRNA *mimic* (miR-mimic) (tubo 1) a la concentración deseada (20-200 nM) como se refleja en la **Tabla 4** y se diluyeron 2,5 µL del agente de transfección DharmaFECT1 (tubo 2), completando en ambos casos con medio de cultivo Opti-MEM hasta un volumen final de 200 µL. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente (20-25°C), se mezcló el contenido del tubo 1 y 2, para un volumen total de 400 µL y esta mezcla fue incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), para permitir la formación de los complejos de transfección, que fueron añadidos gota a gota sobre las células agitando suavemente la placa para asegurarnos de una distribución uniforme de los complejos de transfección. Por último, se incubaron las células con los complejos de transfección bajo las condiciones normales de crecimiento durante 12-24 horas hasta renovar el medio de cultivo. Las células fueron cultivadas entonces 3-7 días adicionales (4-8 días en total desde el día de la transfección).

[nM]	Tubo 1: miR-mimic		Tubo 2: Agente de Transfección		
	miR-mimic 66,7 µM	Opti-MEM	DharmaFECT1	Opti-MEM	Medio Completo
20	0,60 µL	199,4 µL	2,5 µL	197,5 µL	1600 µL
50	1,5 µL	198,5 µL			
100	3 µL	197 µL			
200	6 µL	194 µL			

TABLA 4. Concentración y volumen de los miRNAs específicos o *pool* de miRNAs utilizados.

Para llevar a cabo el proceso de optimización del proceso de transfección y evaluar cualitativamente la eficiencia se utilizó un control positivo de transfección como es el

control de transfección Dy547-labeled miRIDIAN mimic (Dharmacon, CP-004500) que permite una rápida visualización de la entrada de mimic-miRNAs en las células, ya que la transfección puede ser monitorizada y visualizada por epifluorescencia con microscopia óptica.

3.4. Técnicas de biología molecular

3.4.1. Extracción del RNA

La extracción del RNA se llevó a cabo utilizando la técnica del TRIzol descrita por (Chomczynski y Sacchi, 1987). A partir de los muestras celulares o tejidos se procedió a la homogenización añadiendo 1 mL de TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific, 15596026), utilizando la pipeta automática e incubando 5 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). A continuación para conseguir la separación de fases que permita aislar el RNA, se añadieron 200 µL de cloroformo 99,2% (BDH, 22711.290), agitando vigorosamente en vortex 15 segundos e incubando 2-3 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C de forma que se consiguió obtener una fase inferior, una interfase de fenol-cloroformo y una fase superior acuosa que contenía el RNA, por lo que se recogió esta fase acuosa con precaución de no alterar las otras fases.

La siguiente etapa comprende la precipitación del RNA con 500 µL de isopropanol 98,5% (SIGMA, I9392), para ellos se mezcló por inversión varias veces para precipitarlo incubando 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C descartándose el sobrenadante resultante.

Por último, se procedió a una fase de lavado del RNA. Para ello, se resuspendió en 1 mL de etanol 75% (Merck, 08543) para eliminar sales y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, descartando nuevamente el sobrenadante y secando el pellet a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 10 minutos. Finalmente, se resuspendió el

pellet en 10-20 µL de agua grado biología molecular libre de RNasas, DNasas y proteasas (5PRIME, 2500010).

La cuantificación espectrofotométrica se llevó a cabo mediante Nanodrop (ND-100), empleándose como criterios de pureza del RNA el ratio 260/280 (1,8-2) y se mantuvieron los RNAs resultantes a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.4.2. Retrotranscripción o transcripción Inversa

La transcripción inversa, transcripción reversa o retrotranscripción es una reacción que implica la generación de una cadena de DNA de doble cadena complementaria al RNA o miRNA de cadena simple.

La síntesis del DNA complementario (cDNA) de los genes de interés tiene lugar a partir del RNA total, empleándose cebadores aleatorios y la enzima transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia Murina Moloney (M-MLV). La síntesis se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante en tubos de microcentrífuga estériles. En primer lugar, se constituyó la mezcla de 1 µg del RNA total y 1 µL de cebadores aleatorios o *random primers* (Promega, C118A), completándose hasta un volumen final de 10 µL con agua grado biología molecular libre de RNasas, DNasas y proteasas (5PRIME, 2500010). A continuación, se desnaturalizó a 70°C durante 5 minutos para eliminar las estructuras secundarias enfriándose inmediatamente a 4°C para prevenir la reformación de estructuras secundarias. En segundo lugar, se añadieron 15 µL de la mezcla de reacción con los componentes detallados en la **Tabla 5**, para el alineamiento cebador/muestra, finalmente se mezclaron todos los componentes agitando suavemente y el tubo se incubó a 37 °C durante 60 minutos.

Mezcla de Reacción	Volumen (μL)	Concentración
Solución de reacción M-MLV RT 5x (Promega,M531A)	5	1x
dNTPs 10mM (Bioline, BIO39029)	1,25	0,5 mM
Inhibidor RNasas 40 U/ μL (Promega, N211B)	0,6	1 U/μL
M-MLV RT 200U/ μL (Promega, M170A)	0,5	4 U/μL
cDNA 100 ng/μL	10	40 ng/μL
Agua grado biología molecular (5PRIME, 2500010)	7,65	
Volumen Final	25	

TABLA 5. Descripción de los reactivos y concentraciones de los mismos utilizadas durante la transcripción inversa del RNA.

La síntesis del cDNA de los miRNAs de interés tiene lugar a partir del RNA total ajustando su concentración a 5 ng/μL y se utiliza el kit de síntesis universal de cDNA para miRNAs (Exiqon, 203301), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, se incuba la mezcla de reacción (**Tabla 6**) a 60°C durante 1 hora, transcurrido este tiempo se inactiva la reacción enzimática aumentando la temperatura hasta los 95°C durante 5 minutos e inmediatamente se enfría a 4°C.

Mezcla de Reacción	Volumen (μL)	Concentración
Solución de reacción 5x (Exiqon, 203300-04)	2	1x
Mezcla enzimática 10x (Exiqon, 203300-03)	1	1x
RNA total 100 ng/μL	2	20 ng/μL
Agua grado biología molecular (Exiqon, 203300-01)	5	
Volumen Final	10	

TABLA 6. Descripción de los reactivos y concentraciones de los mismos utilizadas durante la transcripción inversa de los miRNAs.

3.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa Inversa (RT-PCR)

Realizada la transcripción inversa a partir del cDNA obtenido de una secuencia específica del RNA de los genes de interés, se obtuvieron múltiples copias mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), un método enzimático de síntesis *in vitro*. La RT-PCR se llevó a cabo con un volumen final de 20 μL y se emplearon los siguientes componentes (**Tabla 7**):

Mezcla de Reacción	Volumen (μL)	Concentración
Solución de reacción 10x (Bioline, BIO-37025)	2	1x
MgCl ₂ 50mM (Bioline, BIO-37026)	0,6	1,5 mM
dNTPs 10mM (Bioline, BIO-39028)	0,4	0,2 mM
BIOTAQ™ 5 U/μL (Bioline, BIO-21040)	0,2	0,05 U/μL
Cebadores 5 μM	2	500 nM
cDNA 10 ng/μL	4	2 ng/μL
Agua grado biología molecular (5PRIME, 2500010)	10,8	
Volumen Final	20	

TABLA 7. Composición de la mezcla de reacción utilizada para llevar a cabo la RT-PCR.

La secuencia de los cebadores de los genes de interés utilizados se detallan en la **Tabla 8**, analizándose la expresión de Oct4, Nanog y Sox2 como marcadores de expresión de pluripotencia; Sox17, Foxa2, Pdx1, Neurog3, Nkx6.1, Pax6, Pax4, Ptf1, Mist1, Gcg, Ins-I, Ppy, Sst, Amy2a5 y Ctrb1 como marcadores de expresión del desarrollo pancreático; Sox7 como marcador de endodermo temprano; Sox1 y Brachyury como marcadores ectodérmico y mesodérmico respectivamente; y se usaron como genes de referencia Tbp y Actb:

Gen	Secuencia del Cebador (5'-3')	Tamaño Amplicón (pb)
Oct4	F:GGCGTTCTCTTTGGAAAGGT R:TCTCATTGTTGTCGGCTTCCT	113
Nanog	F:AGGGTCTGCTACTGAGATGCTC R:CAACCACTGGTTTTCTGCCACC	366
Sox2	F:CACAGATGCAACCGATGCA R:GGTGCCCTGCTGCGAGTA	127
Sox7	F:TGGACACGTATCCCTACGGG R:TCCTGACATGAGGACGAGAAG	96
Sox17	F:CTTTATGGTGTGGGCCAAAG R:GGTCAACGCCTTCCAAGACT	116
Foxa2	F:CCCTACGCCAACATGAAGTCG R:GTTCTGCCGGTAGAAAGGGA	222
Pdx1	F:CCCCAGTTTACAAGCTCGCT R:CTCGTTTCATTCCGGGAAAGG	177
Neurog3	F:CTTCACAAGAAGTCTGAGAACACCAG R:CTGCGCATAGCGGACCACAGCTTC	232
Nkx6.1	F:CTGCACAGTATGGCCGAGATG R:CCGGGTTATGTGAGCCCAA	136
Pax6	F:GCAGATGCAAAAGTCCAGGTG R:CAGGTTGCGAAGAACTCTGTTT	285
Pax4	F:GCAGTGTGAATCAGCTAGGGG R:CAGGGTCGCATCCCTCTTATT	103

Ptf1	F:TCCCATCCCCTTACTTTGATGA R:GTAGCAGTATTCGTGTAGCTGG	140
Mist1	F:GCTGACCGCCACCATACTTAC R:TGTGTAGAGTAGCGTTGCAGG	198
Gcg	F:TACTTTGTGGCTGGATTGCTT R:AGTGGCGTTTGTCTTCATTCA	149
Ins-I	F:CACTTCCTACCCCTGCTGG R:ACCACAAAGATGCTGTTTGACA	81
Ppy	F:CAGGCGACTATGCGACACC R:CAGGGAATCAAGCCAAGTGG	175
Sst	F:ACCGGGAACAGGAACTGG R:TTGCTGGGTTTCGAGTTGGC	160
Amy2a5	F:CCAAGGAAGCAGACCTTTCA R:ACACGGCCATTTCCAAAGTA	149
Ctrb1	F:AACGGAGAGGATGCTATCCCT R:GACCACCCAGTTTTGCTGA	108
Actb	F:TGGGAATGGGTCAGAAGGAC R:TGAAGCTGTAGCCACGCTCG	467
Sox1	F:AAGGAACACCCGGATTACAAGT R:GTTAGCCCAGCCGTTGACAT	242
Brachyury	F:GCGGACAATTCATCTGCTTG R:TGGGATACTGGCTAGAGCCA	124
Tbp*	Tataa Biocenter's	174

TABLA 8. Lista y secuencia de cebadores usados para RT-PCR y qPCR de las CTEs murinas. Cebador F: cebador sentido; cebador R: cebador antisentido. *Cebador del panel de genes de referencia humanos comerciales suministrados por Tataa Biocenter's (Gotemburgo, Suecia).

La reacción se realizó con los siguientes parámetros, una desnaturalización inicial realizada a 95°C durante 15 minutos seguida de 26 ciclos de una RT-PCR de 3 etapas para la hibridación y extensión: 95°C 1 minuto, 60°C 1 minuto y 72°C 1 minuto. Finalmente se llevó a cabo una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

El análisis de los productos de amplificación obtenidos se realizó mediante electroforesis (100 mV) en geles de agarosa 2% teñidos con GelRed (Biotium, 41003), que fueron sumergidos en tampón TAE 1x (5PRIME, 2500060). Para la visualización de la banda de amplificación, los geles fueron sometidos a luz ultravioleta en el transiluminador (Gel Doc XR+ System, Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU) y las imágenes fueron tomadas y archivadas con el software Quantity One 4.6.

3.4.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) es una variación de la PCR estándar descrita previamente, utilizada para la cuantificación del DNA o RNA de una muestra, mediante el método cuantificación relativa normalizada respecto a un gen de referencia. La cuantificación de genes de interés en nuestro estudio se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL y por triplicado para cada muestra y se emplearon los siguientes componentes (**Tabla 9**):

Mezcla de Reacción	Volumen (μL)	Concentración
SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX Kit 10x (Bioline, 94020)	10	1x
Cebadores 5 μM	1,6	400 nM
cDNA 10 ng/ μL	4	2 ng/ μL
Agua grado biología molecular (5PRIME, 2500010)	4,4	
Volumen Final	20	

TABLA 9. Composición de la mezcla de reacción utilizada para llevar a cabo la qPCR.

La reacción se realizó con los siguientes parámetros, una desnaturalización inicial realizada a 95°C durante 2 minutos seguida de 40 ciclos de una qPCR de 2 etapas para la hibridación y extensión, durante la cual se recogen los datos de fluorescencia emitidos por los fluoróforos de las sondas en cada uno de los ciclos: 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 1 minuto.

La principal limitación de las sondas inespecíficas como el *SYBR GREEN* es que al unirse al total de ácidos nucleicos en la reacción de la qPCR, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son como pueden ser los dímeros de los oligonucleótidos. Para hacer frente a esta situación realizó un análisis de los resultados en la curva de fusión (Curva de disociación o curva de *melting*). Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los productos amplificados específicos. Los resultados de la qPCR se analizaron con el ViiA™ 7 Software (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados para las muestras del cDNA de las CTEs murinas se detallan previamente en la **Tabla 8**, utilizándose como gen de

referencia Tbp y los cebadores utilizados para las muestras del cDNA de las CTEs humanas están detallados en la siguiente **Tabla 10**, utilizando en este caso como genes de referencia *RPLP*, *ACTB* y *TUBB*:

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño Amplicón (pb)
<i>OCT4</i>	F:GTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG R:AAGGGCCGCAGCTTACACATGTTC	245
<i>NANOG</i>	F:GCGCGGTCTTGGCTCACTGC R:GCCTCCCAATCCCAACAATACGA	405
<i>SOX2</i>	F:ATGCACCGCTACGACGTGA R:CTTTTGCACCCCTCCCATTT	437
<i>SOX1</i>	F:AACACTTGAAGCCCAGATGGA R:GCAGGCTGAATTCGGTTCTC	150
<i>BRACHYURY</i>	F:TGCTTCCCTGAGACCCAGTT R:GATCACTTCTTTCTTTGCAT	121
<i>FLK1</i>	F:GTGATCGGAAATGACACTGGAG R:CATGTTGGTCACTAACAGAAGCA	124
<i>SOX7</i>	F:ACGCCGAGCTCAGCAAGAT R:TCCACGTACGGCCTCTTCTG	73
<i>SOX17</i>	F:TGGACCGCACGGAATTTGAACA R:TGTGTAACACTGCTTCTGGCCT	221
<i>FOXA2</i>	F:TTGCTGGTCGTTTGTGTGGCT R:TTCATGTTGCTCACGGAGGAGT	153
<i>PDX1</i>	F:TACTGGATTGGCGTTGTTTGTGGC R:AGGGAGCCTTCCAATGTGTATGGT	133
<i>GSC</i>	F:GAGGAGAAAGTGGAGGTCTGG R:CTCTGATGAGGACCGTTCTG	72
<i>HNF1B</i>	F:TCACAGATACCAGCAGCATCAGT R:GGGCATCACCAGGCTTGTA	79
<i>HNF4α</i>	F:CATGGCCAAGATTGACAACCT R:TTCCCATATGTTCTGCATCAG	113
<i>PAX6</i>	F:CTCGGGCACCCTTCAACA R:TCCGGGAACCTGAACTGGAA	64
<i>NKX6.1</i>	F:AGGGCTCGTTTGGCCTATTC R:AGAGGCTTATTGTAGTCGTCGT	194
<i>NKX2.2</i>	F:ACCAAACCGTCCCAGCGTTA R:GGCTGACAATATCGCTACTCACACA	116
<i>MAFA</i>	F:GTCCGCTTGTACATACGTTGA R:AAAGGGAGGCTGAGAAGAGA	138
<i>GLUT2</i>	F:TTCCGGAATCAATGGCATT R:TGTTTACAGCGCCAACCTCA	101
<i>INS</i>	F:TTTGTGAACCAACACCTGTGCGG R:TTGTTCCACAATGCCACGCTTCTG	210
<i>NEUROG3</i>	F:CTAAGAGCGAGTTGGCACTGA R:GAGGTTGTGCATTGATTGCG	86
<i>NEUROD1</i>	F:GGATGACGATCAAAAAGCCCAA R:GCGTCTTAGAATAGCAAGGCA	179

<i>ACTB</i>	F:CGCACCCTGGCATTGTCAT R:TTCTCCTTGATGTCACGCAC	206
<i>TUBB*</i>	Tataa Biocenter's	150
<i>RPLP*</i>	Tataa Biocenter's	161

TABLA 10. Lista y secuencia de cebadores usados para qPCR de genes de las CTEs humanas. Cebador F: cebador sentido; cebador R: cebador antisentido. *Cebador del panel de genes de referencia humanos comerciales suministrados por Tataa Biocenter's (Gotemburgo, Suecia).

La qPCR para el análisis de los miRNAs se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl y por triplicado para cada muestra y se emplearon los siguientes componentes (**Tabla 11**):

Mezcla de Reacción	Volumen (µL)	Concentración
ExiLENT SYBR® Green master mix 10x (Exiqon, 94020)	5	1x
Cebadores 10x5x	1	1x
cDNA 0,25 ng/µL	4	0,1 ng/µL
Volumen Final	10	

TABLA 11. Composición de la mezcla de reacción utilizada para llevar a cabo la qPCR.

La reacción se llevó a cabo con los siguientes parámetros, una desnaturalización inicial realizada a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos de una qPCR de 2 etapas para la hibridación y extensión, durante la cual se recogen los datos de fluorescencia emitidos por los fluoróforos de las sondas en cada uno de los ciclos: 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 1 minuto. Realizándose como se describió previamente un análisis de especificidad de los resultados con la curva de disociación y los resultados de la qPCR se analizaron también con el ViiA™ 7 Software (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados se obtuvieron de Exiqon y se detallan en la siguiente **Tabla 12**, empleándose como gen de referencia un pequeño RNA nucleolar, SNORD48 o RNU48:

miRNA	Nº Acceso	Secuencia del cebador (5'-3')	Nº Catálogo
hsa-miR-7-5p	MIMAT0000252	UGGAAGACUAGUGAUUUUUGUUGU	205877
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	204066
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	204243
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG	205702
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	206023
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	UAGCACCAUCUGAAAUUCGGUUA	204698
hsa-miR-29b-3p	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUUCAGUGUU	204679
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	UAGCACCAUUUGAAAUUCGGUUA	204729

hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG	206047
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	205867
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	205869
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	U AACACUGUCUGGUAACGAUGU	204707
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA	204482
hsa-miR-375	MIMAT0000728	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	204362
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	204508
SNORD48	NR_002745	AGUGAUGAUGACCCCAGGUAACUCUGAGUGU GUCGCUAUGCCAUCACCGCAGCGCUCUGACC	203903

TABLA 12. Lista y secuencia de cebadores usados para qPCR de los miRNAs.

El análisis por PCR en tiempo real se ha realizado de manera relativa, este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés respecto a un gen de expresión constante que actúa como control endógeno o constitutivo. Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del estándar interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno. Es necesario normalizar los datos entre el valor que se obtiene para el gen blanco y el del gen endógeno, de tal manera que los valores resultantes sean reflejo de los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida. La normalización de la expresión génica se llevó a cabo mediante el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak y Schmittgen, 2001). Este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre una muestra experimental o gen de interés y un calibrador o gen endógeno, cuyas eficiencias de amplificación (E) deben ser comparables. Se obtienen los valores de $\Delta Ct = (C_t^{\text{gen}} - C_t^{\text{endógeno}})$ y la cantidad relativa en cada muestra viene definida por la siguiente fórmula: $2^{-(\Delta Ct, r-\Delta Ct, cb)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde r es la muestra de referencia y cb la muestra calibrador.

3.4.5. Microarray de expresión génica de miRNAs

El microarray utilizado en este estudio presenta un formato de 8x15K, esto implica que en un solo porta (*slide*) se integran 8 *arrays* individuales impresos utilizando la tecnología Agilent's 60-merSurePrint technology, permitiendo así analizar 8 ensayos distintos de un solo color en un mismo cristal. A su vez, cada *array* incluye

aproximadamente 15.000 sondas diseñadas a partir de la información existente en la base de datos Sanger miRBase. Las sondas son oligonucleótidos de 60-mer directamente sintetizados sobre el *slide*. El microarray fue realizado por la unidad de apoyo de Genómica de CABIMER utilizando los protocolos y las recomendaciones del fabricante para este tipo de *array*. En el *Human microRNA Microarray* están representados 939 miRNAs (850 humanos y 89 virales). La mayoría de estos miRNAs tiene en la placa varios cebadores para detectarlos, aumentando la especificidad. El resto de sondas son controles replicados varias veces y en varias posiciones dentro de cada *array*, los cuales el fabricante Agilent no recomienda que se utilicen para normalizar sino únicamente para evaluar la eficiencia del marcaje e hibridación. Los datos de intensidad de fluorescencia de cada uno de las sondas han sido obtenidos mediante el software GenePix Pro 7.0. Posteriormente, se corrigió el ruido de fondo (*background*) mediante el algoritmo normexp (Ritchie et al., 2007) y se ha realizó una normalización entre *arrays* por cuantiles. Finalmente, las sondas que se corresponden con un mismo miRNA han sido sumariadas mediante la mediana de los respectivos datos de expresión normalizados. Una vez hecho, esto se aplicó el test estadístico limma (Smyth, 2004) para el estudio de la expresión diferencial en las distintas condiciones experimentales y se representaron los resultados mediante *Heatmap*, que consiste en una representación gráfica de los datos a partir de valores individuales contenidos en una matriz representada con una escala de colores, elaborado con el software libre para análisis estadístico R.

Como se puede apreciar de forma esquematizada en la **Figura 11**, los resultados significativamente estadísticos del análisis de expresión de los miRNAs mediante microarray deben ser validados, para ello normalmente se utilizan una serie de técnicas como qPCR, *Northern blotting* (NB), *Western Blotting* (WB) e incluso el uso de múltiples plataformas de microarrays, siendo la herramienta de validación más ampliamente utilizada la qPCR para confirmar los datos de expresión génica obtenidos.

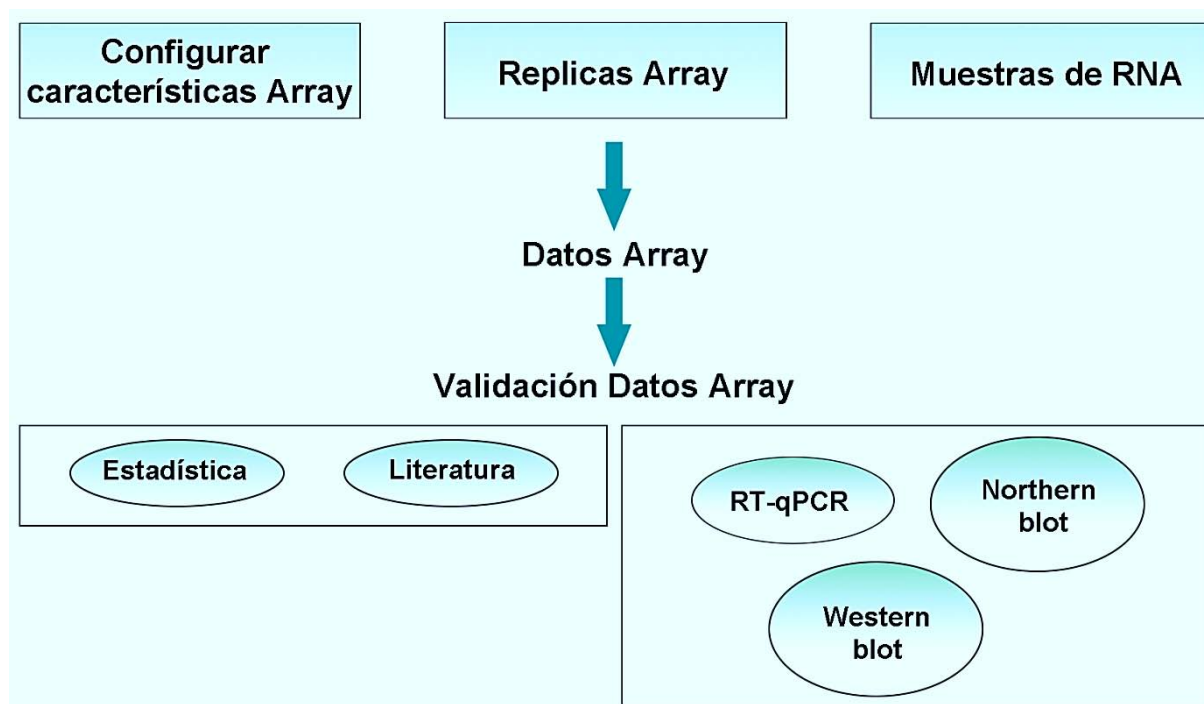


FIGURA 11. Pasos comunes empleadas para garantizar la calidad y la validez de los resultados de microarrays. Desde un punto de vista de control de calidad, las réplicas deben realizarse usando muestras de RNA preparadas al mismo tiempo en las mismas condiciones. Para verificar los resultados generados del experimento de microarray, normalmente es necesario un enfoque combinatorio que incluye comprobar la significación estadística asociada a los niveles de expresión de específicos miRNAs, revisar la literatura y la realización de experimentos adicionales tales como qPCR, NB o WB.

3.4.6. Hibridación *in situ* (ISH) de miRNAs

La hibridación *in situ* (ISH) nos permite visualizar secuencias de DNA o RNA en el interior de la célula, mediante la hibridación de fragmentos marcados del DNA de una hebra o RNA con secuencias complementarias (sondas) al DNA o RNA celular, que en condiciones apropiadas forman híbridos estables. En este estudio empleamos una técnica de ISH con sondas marcadas no radiactivas para la visualización de los miRNAs de interés, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Affymetrix). Brevemente, las muestras celulares se fijaron en paraformaldehído 4% durante 1 hora y a temperatura ambiente (20-25°C), después de 3 lavados se realizó un pretratamiento de la muestra, en primer lugar con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C) para mejorar la fijación, ya que inmoviliza irreversiblemente los miRNAs formando enlaces más estables y

posteriormente un tratamiento con detergentes durante 10 minutos y proteasas otros 10 minutos, para facilitar la accesibilidad al miRNA de interés, lavando 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) entre ambos y finalmente con una solución de lavado. Realizado este tratamiento previo se procedió a la amplificación y detección de los miRNAs, para ello antes de realizar la hibridación con la sonda marcada específica, se llevó a cabo un proceso de acondicionamiento incubando la muestra con una solución preamplificadora durante 1 hora a 40°C y después de 3 lavados con solución de lavado, una nueva incubación con una solución amplificadora durante 1 hora a 40°C, volviendo a lavar 3 veces. Tras lo cual se procedió a la hibridación con la sonda durante 1 hora a 40°C y se realizaron 3 lavados de las muestras hibridadas para remover sondas no específicas. La etapa final de la ISH conlleva la detección de la sonda conjugada con fosfatasa alcalina, mediante una reacción colorimétrica con un sustrato cromogénico como es el *Fast Red*, visualizándose el complejo como un precipitado rojo y la incubación de las muestras durante 5 minutos con Hoechst33342 1 µg/mL (Sigma, B2261), para marcar los núcleos.

3.4.7. Extracción de proteínas

Para obtener los extractos proteicos totales, las muestras celulares se lavaron con PBS y se añadió el tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA *buffer*; Sigma, R0278), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas 1x (SIGMA, 11697498001), incubando las muestras a 4°C durante 20 minutos, mezclando cada 5 minutos por vortex. A continuación, se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante que contiene el extracto de proteínas totales. La determinación de la concentración de proteínas en los distintos extractos proteicos se realizó espectrofotométricamente, mediante el método colorimétrico Bradford (Bradford, 1976). Como estándar se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA: Sigma, A4503), en concentraciones seriadas de 0, 125, 250, 500, 1000 y 1400 (µg /mL). Sobre una placa multipocillo se añadieron 5 µL de cada una de las concentraciones de BSA por

triplicado, así como de cada una de las muestras con diluciones 1/10 y se añadieron 250 μ L del reactivo Bradford (Sigma, B6916) sobre cada uno de los pocillos. La placa fue incubada 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en agitación, momento en que se cuantificó la absorbancia producida a una longitud de onda de 595 nm en un lector de placas (Varioskan, Thermoelectron Corporation) y la concentración de proteínas se determinó mediante la extrapolación a partir de la curva de regresión generada con la curva estándar de BSA. Finalmente, las proteínas fueron almacenadas a -20°C hasta ser utilizadas.

3.4.8. Electroforesis en SDS-PAGE

Los extractos proteicos (20-50 μ g, según la proteína a analizar) se suspendieron en solución Laemmly (Tris-HCl 312,5 mM pH 8,5, SDS 5%, Glicerol 25%, azul de bromofenol 0,015% y 2-mercaptoetanol 2,5%), calentándose a 98°C durante 10 minutos para desnaturalizar las estructuras proteicas y enfriando rápidamente a 4°C para mantener las proteínas desnaturalizadas. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, 8-12%), utilizando un sistema de electroforesis vertical (Mini Protean-3, Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU) y un tampón compuesto por Tris-HCl 5mM, Glicina 50 mM, SDS 0,2% y pH 8,3. Así mismo, se utilizó un marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific, 11834544). La electroforesis se llevó a cabo a 120 V (voltaje constante). Una vez terminada la electroforesis los geles SDS-PAGE se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección.

3.4.9. Transferencia e inmunodetección de las proteínas: Western Blot (WB)

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE fueron transferidas electroforéticamente a membranas de PVDF (GE Healthcare, 10600023), mediante transferencia húmeda. Las membranas fueron activadas sumergiéndolas en metanol durante 15 segundos y posteriormente en el tampón de transferencia (Trizma-base 0,3%, glicina 1,4%, SDS

0,03% y metanol 20%). En dicho tampón también se introdujeron las esponjas y los filtros Whatman (GE Healthcare, 3030-153), utilizados posteriormente para montar el sistema de transferencia junto con las rejillas del equipo de transferencia (Trans-Blot Transfer Cell, BIORAD), la cual se llevó a cabo aplicando amperajes de 90 mA durante 18 horas o 250 mA durante 3 horas. A continuación, las membranas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C) o durante 18 horas a 4°C en agitación constante con leche desnatada 5% (Sveltesse, Nestle) en TBS-T (TBS, Tween-20 0,1%).

La incubación de las membranas con el anticuerpo (Ab) primario (**Tabla 13**) se llevó a cabo en la solución de Ab (TBS-T suplementado con BSA 5%) a 4°C durante 18 horas. Tras la incubación las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T e incubadas con el correspondiente Ab secundario (**Tabla 13**) en la solución de Ab a temperatura ambiente (20-25°C) durante 1 hora. Después de lavar 3 veces con TBS-T las membranas de PVDF se revelaron, con el reactivo de Amersham ECL Plus (Millipore) que permitió visualizar la luminiscencia generada como consecuencia de la inmunodetección. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 30 segundos con ECL Plus (GE Healthcare, RPN2133) y fueron colocadas en un cassette de revelado (Hypercassette, Amersham Biosciences), depositándose sobre las membranas las películas fotográficas (GE Healthcare, 28906844), que fueron reveladas automáticamente en la máquina reveladora (Amersham Biosciences). La intensidad de la banda obtenida como resultado del revelado se relaciona proporcionalmente con la luminiscencia emitida tras la inmunodetección.

Ab primario	Antígeno	Enzima asociada	Dilución	Referencia
Anti-OCT4	OCT4	Mouse Monoclonal	1/1000	BDBiosciences, 611202
Anti-SOX2	SOX2	Mouse Monoclonal	1/2500	R&D Systems, MAB2018
Anti-NANOG	NANOG	Mouse Monoclonal	1/4000	Bethyl, A300-397A
Anti-ACTB	β-ACTINA	Mouse Monoclonal	1/10000	Sigma, A5441
Ab secundario	Antígeno	Enzima asociada	Dilución	Referencia
Anti-Mouse	IgG Mouse	HRP Peroxidasa	1/20000	Jackson, 115-035-003

TABLA 13. Listado de anticuerpos utilizados en los ensayos de WB llevados a cabo con las CTEs. En la tabla se describe el Ab, dilución utilizada y referencia del producto.

3.4.10. Inmunofluorescencia (IF)

Las células sembradas en placas de cultivo, se lavaron con PBS y fueron fijadas con paraformaldehído 4% (Sigma, P6148) durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), después de un lavado con la solución de lavado (BSA 0,1% en PBS) fueron permeabilizadas con el detergente Triton® X-100 0,5% (Sigma, T8787) en PBS durante 5 minutos. A continuación, se incubaron en la solución de bloqueo (BSA 4% y Triton® X-100 0,3% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).

Para la inmunodetección, las células se incubaron en la solución de dilución del Ab (BSA 1% Triton® X-100 0,3% en PBS) junto con el Ab primario (**Tabla 14**) a 4°C durante 18 horas. Posteriormente, se lavaron 3 veces con solución de lavado (0,1% BSA en PBS) y se incubaron con el Ab secundario (**Tabla 14**) diluido en la solución de dilución de Ab durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C). A continuación, las células se lavaron 3 veces con solución de lavado y se incubaron durante 5 minutos con Hoechst33342 1 µg/mL (Sigma, B2261) para marcar los núcleos. Finalmente, tras lavar 1 vez con PBS como se indica con más detalle en el apartado 3.6, la fluorescencia se analizó mediante microscopia.

Ab primario	Antígeno	Enzima asociada	Dilución	Referencia
Anti-OCT4	OCT4	Mouse Monoclonal	1:250	BDBiosciences, 611202
Anti-SOX2	SOX2	Mouse Monoclonal	1:500	R&DSYSTEMS, MAB2018
Anti-FOXA2	FOXA2	Goat Policlonal	1:500	R&DSYSTEMS, AF2400
Anti-PDX1	PDX1	Goat Policlonal	1:500	R&DSYSTEMS, AF2419
Anti-NKX6.1	NKX6.1	Mouse Monoclonal	1:250	R&DSYSTEMS, MAB5857
Anti-INSULINA	INSULINA	GuineaPig Policlonal	1:500	Dako, A0564
Anti-PÉPTIDO-C	PÉPTIDO-C	Mouse Monoclonal	1:500	Millipore,05-1109
Ab secundario	Antígeno	Enzima asociada	Dilución	Referencia
Anti-Mouse	IgG Mouse	Alexa Fluor®594	1:1000	Invitrogen, A11032
Anti-Mouse	IgG Mouse	Alexa Fluor®488	1:1000	Invitrogen, A11029
Anti-Goat	igG Goat	Alexa Fluor®488	1:1000	Invitrogen, A11055
Anti-Guinea Pig	IgG GuineaPig	DyLight 549	1:4000	Rockland, 606-142-129

TABLA 14. Listado de anticuerpos utilizados en los ensayos de IF llevados a cabo con las CTEs. En la tabla se describe el Ab, dilución utilizada y referencia del producto.

3.4.11. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para el análisis de secreción de insulina y péptido C de las CTEs diferenciadas a células productoras de insulina, las células fueron tratadas según el protocolo de diferenciación y después de un lavado con PBS se incubaron a 37°C durante 1 hora con una solución de KREBS (NaCl 129 mM, KCl 4,8 mM, NaHCO₃ 5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM y BSA 0,1% pH 7,4) sin glucosa. Las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con una solución de KREBS que contenía diferentes concentraciones de glucosa (2-20 mM) y finalmente se incubaron las células con KCl (30 mM), que puede ser usado para la estimulación de liberación de insulina, puesto que desencadena la despolarización parcial de células beta pancreáticas al reducir la permeabilidad al K⁺. La despolarización da lugar a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y el resultante influjo de Ca²⁺, que ocasiona la liberación de insulina. Los sobrenadantes después de cada estimulación fueron recolectados y los niveles de insulina y péptido C se midieron por duplicado en 3 réplicas usando el kit comercial para ensayo de ELISA de insulina humana (Mercodia, 10-1132-01) y péptido C humano (Mercodia, 10-1141-01) y según el protocolo de la casa comercial.

3.4.12. Fosfatasa alcalina

Para la utilización de la fosfatasa alcalina se utilizó un kit de tinción (Stemgent, 00-0055) siguiendo las indicaciones del fabricante. Previo a la tinción, las células fueron fijadas. Para ello se retiró el medio de cultivo y se lavó cada pocillo con 2 mL de PBS. Luego se agregó 2 mL de solución de fijación durante 2-5 minutos a temperatura ambiente (24°C) y se retiró para luego lavar con 2 mL de PBS. Se procedió a la tinción añadiendo 1,5 mL de solución reactiva de la fosfatasa alcalina incubando las células en oscuridad durante 5-15 minutos, finalmente se retiró la solución reactiva de la fosfatasa alcalina y se lavó con 2 mL de PBS. La expresión de la fosfatasa alcalina quedo reflejada por una tinción roja o púrpura de las células observadas en el microscopio invertido.

3.5. Microscopía

La visualización de las células se realizó mediante un microscopio invertido Olympus IX71 (Olympus, Tokyo, Japón), con sistema de captura de imágenes (Nikon Eclipse TS100/TS100-F) con contraste de fases para obtener campos claros y lámpara de mercurio con los filtros correspondientes para la visualización de fluorescencia. El control de la cámara y procesamiento de las imágenes requirió del software Olympus DP controller y DP manager versión 1.2.1.107 (Olympus, Tokyo, Japón). Las imágenes confocales fueron obtenidas utilizando el microscopio confocal invertido TCS SP5 Leica DMI6000 (Leica, Wetzlar, Alemania) que requiere el software LAS-AF versión (Leica, Wetzlar, Alemania) para el control de la exploración, visualización y adquisición de las imágenes.

El análisis de cuantificación de la fluorescencia se realizó mediante el software MetaMorph versión 7.5.1.0. (MDS *Analytical technologies*, Sunnyvale, CA, USA). Para ello, se utilizó la relación de los valores de intensidad del marcador fluorescente (Alexa Fluor®) y el marcador de núcleos (Hoechst 33342), por encima de la señal inespecífica de ruido de fondo (*background*) procedente de la IF emitida por el sustrato y los datos se expresaron como unidades arbitrarias (AU). La cuantificación fue realizada en al menos 50 células por experimento de 3 experimentos independientes.

3.6. Análisis bioinformático

El estudio nos proporciona el estado de expresión (inhibición o sobreexpresión) de una lista de genes durante el proceso de diferenciación pancreático, que se relacionó con la lista de los miRNAs con diferencias de expresión significativas detectados en el microarray de muestras de páncreas, islotes pancreáticos, y las CTEs diferenciadas y no diferenciadas.

Se procedió a la combinación de ambos resultados en un análisis bioinformático, para intentar elucidar las rutas de señalización y redes de expresión génica en las que están

implicados los miRNAs diferencialmente expresados. Para ello, con el objetivo de facilitar la interpretación de las funciones biológicas afectadas por los miRNAs con una expresión diferencial reflejada en el Microarray y confirmado por qPCR, una predicción tanto funcional como de dianas génicas fue realizada usando la base de datos miRSystem. Esta se encuentra integrada por un sistema para la caracterización de funciones y rutas de señalización enriquecidas de dianas de miRNAs. Para identificar rutas de señalización o funciones biológicas destacadas, se aplicó la relación Observados-Esperados (O/E) de genes diana, donde la probabilidad de identificación observada (O) para un gen dado viene dado por la proporción de los miRNAs consultados predichos como diana de ese gen, mientras que la probabilidad esperada (E) la determina la proporción de todos los miRNAs de la base de datos miRsystem predichos como dianas de ese gen. Este parámetro constituye un indicador de la significación estadística que se le otorga a la posible unión miRNA/mRNA diana, dependiente de una serie de valoraciones energéticas y de posición para esa unión y representa la probabilidad de que un gen diana sea seleccionado al azar por los miRNAs, así como también se aplicaron otros análisis estadísticos como el valor hipergeométrico y empírico de la permutación, y un ranking de puntuación de las rutas de señalización a partir del valor de expresión relativa de los miRNAs.

3.6.1. Análisis predictivo de dianas de miRNAs

El análisis bioinformático de los genes diana potencialmente regulados por los miRNAs en estudio a partir de los genes diferencialmente expresados, se llevó a cabo aplicando los recursos bioinformáticos actualmente disponibles en la Red como es la base de datos online MirSystem que alberga 2 bases de datos de experimentos validados y 7 bases de datos de predicción de dianas de los miRNAs:

- TarBase (Version 7.0)
- miRecords (Abril, 2013)

- Diana-microT (Version 5.0)
- miRanda (Agosto, 2010)
- miRBridge (Abril, 2010)
- PicTar (Marzo, 2007)
- PITA (Agosto, 2008)
- RNA22 (Version 2.0)
- TargetScan (Version 7.1)

Para aumentar la fiabilidad de las predicciones con un número manejable de registros, los miRNAs y su expresión relativa fueron introducidos en la base de datos miRSystem, con el fin de dilucidar las rutas de genes, funciones biológicas y rutas canónicas más alteradas en nuestros datos. Solo las dianas de miRNAs validadas o identificadas por al menos 4 programas de predicción fueron consideradas para la anotación en las rutas de señalización de la base de datos KEGG o de funciones moleculares registradas en el proyecto Ontología Génica (GO). Además, los parámetros fueron configurados para un límite de 25-500 genes por ruta de señalización o función biológica, una relación observados-esperados igual o superior a 1,8 ($O/E \geq 1,8$) y un ranking de puntuación igual o superior a 1 ($score \geq 1$). Esta puntuación se determina a partir de los niveles de expresión de los miRNAs a comparar entre el grupo experimental y control mediante el método *weighted pathway-ranking*, que consiste en asignarles un peso calculado dividiendo el valor absoluto de la expresión de cada miRNA por la suma absoluta de los valores de expresión de todos los miRNAs de entrada ($\sum \forall miRNA^{wi}$). A continuación, después de identificar los genes diana mediante los algoritmos de selección definidos anteriormente se obtiene un valor p (P_i) para ellos y finalmente se calcula la puntuación o *score* ($\sum \forall miRNA^{wi} [-\log_{10}(p_i)]$).

3.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Se presentan los datos, para cada conjunto de muestras, como el valor promedio \pm el error estándar de la media (SEM). Para el tratamiento estadístico de los datos de los que constan los diferentes estudios de este trabajo, fue necesario el uso del software GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). El análisis de las diferentes condiciones experimentales para determinar las diferencias estadísticamente significativas se llevó a cabo mediante análisis de variación unidireccional (ANOVA) para múltiples comparaciones, seguido por la corrección de Holm-Šidák para comparar promedios entre 2 grupos a un nivel de significancia del valor p de al menos 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de líneas celulares pluripotentes

El estudio realizado requiere líneas celulares pluripotentes capaces de diferenciarse *in vitro* en derivados de alguno de los posibles linajes embrionarios: endodermo, mesodermo y ectodermo. En nuestro laboratorio contamos con varias líneas celulares de CTEs de origen humano (HS181) o murino (ES-D3), así como líneas celulares de iPSCs de origen humano (MSUH-001). La trazabilidad de las líneas celulares pluripotentes utilizadas con el fin de definir inequívocamente que se trata de poblaciones de CTEs o iPSCs y demostrar su pluripotencia, es llevada a cabo por un personal técnico cualificado y en dedicación exclusiva a los procesos a esta caracterización que incluye principalmente los siguientes parámetros:

- **Morfología Celular:** las células fueron cultivadas *in vitro* como se ha descrito previamente por un largo número de pases (<100) sin que presenten modificaciones en su morfología o aspecto. Una vez iniciado el cultivo las células fueron observadas diariamente bajo microscopía óptica (**Figura 12**), para evaluar su morfología, observándose durante los sucesivos pases la formación de colonias que adoptan la típica forma descrita con bordes netos y compactos. Las células embrionarias presentan una relación núcleo/citoplasma alta, con nucléolos prominentes.

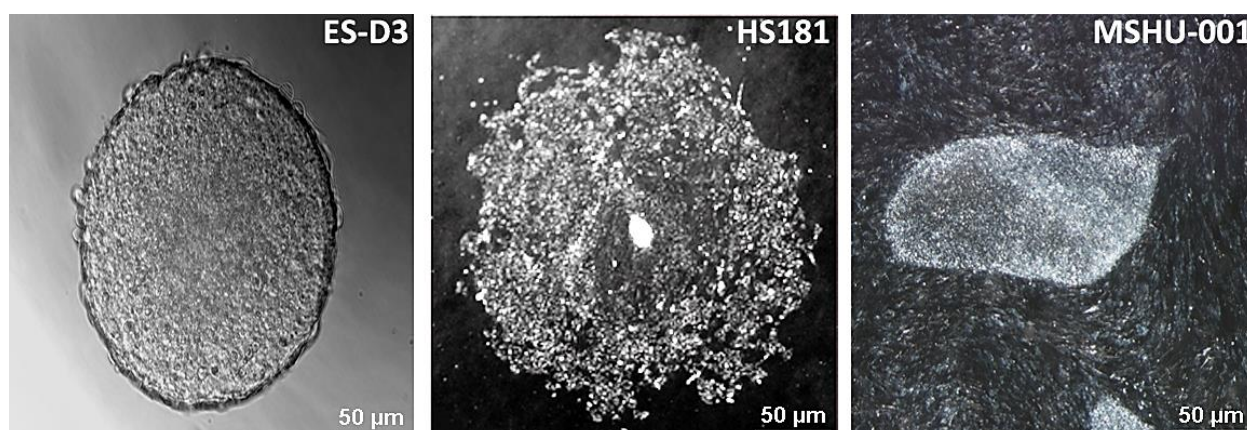
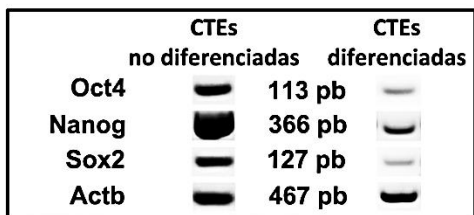
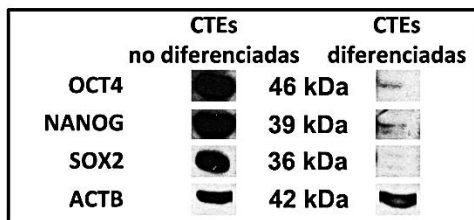


FIGURA 12. Se observan fotografías en campo claro de las células pluripotentes de origen murino (ES-D3) y humano (HS181 y MSHU-001), agrupadas densamente y formando colonias de bordes netos características de un estado no diferenciado mantenido en cultivo *in vitro*. Barra de escala =50 µm.

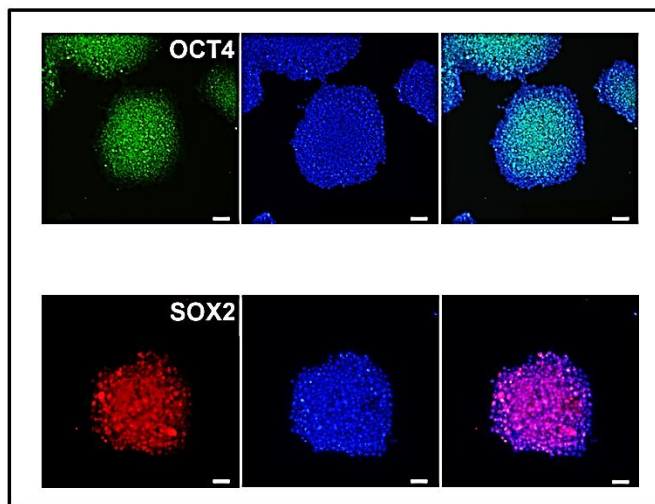
- **Análisis de factores de transcripción responsables de la pluripotencialidad:** el carácter pluripotente de las colonias de células no diferenciadas viene definido por diversos factores de transcripción entre los que podemos destacar la expresión de los marcadores pluripotentes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*. Como se muestra en la **Figura 13**, estudios de RT-PCR indicaron que las CTEs murinas (ES-D3) y humanas (HS181), expresan marcadores nucleares de pluripotencia (*OCT4*, *NANOG* Y *SOX2*), los cuales se han descrito como reguladores clave de las redes de pluripotencia y nos indica que conservan un estado no diferenciado cuando son cultivadas en las condiciones *in vitro* de mantenimiento requeridas. Esta expresión a nivel génico fue confirmada también por la identificación de estos factores de transcripción pluripotentes mediante WB que refleja además como la abundante expresión en células no diferenciadas se pierde con la diferenciación de las células, mientras que la IF nos muestra la expresión homogénea en las colonias de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *NANOG* y *SOX2*), que puede verse disminuida en las células de la periferia de las colonias debido al inicio de procesos de diferenciación en esta zona.



RT-PCR de marcadores de pluripotencia en las CTEs murinas (ES-D3)



WB de marcadores de pluripotencia en las CTEs murinas (ES-D3)



Detección inmunofluorescente de marcadores de pluripotencia en las CTEs murinas (ES-D3)

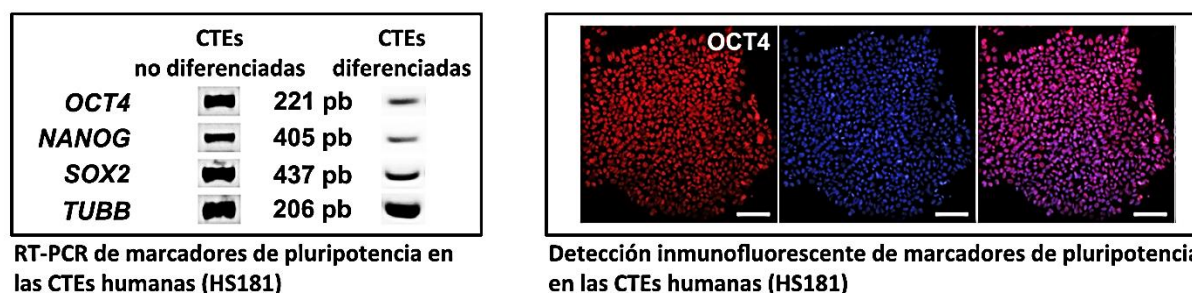


FIGURA 13. Caracterización de los marcadores de pluripotencia (OCT4, NANOG y SOX2) de las células pluripotentes en estado no diferenciado mediante RT-PCR, WB y detección de inmunofluorescencia en las CTEs murinas (ES-D3) y humanas (HS181). Barra de escala = 2 μ m.

- **Análisis de marcadores de membrana.** Otro factor importante que define a las células pluripotentes es la expresión de marcadores de superficie de membrana exclusivos como SSEA-4 y las glicoproteínas transmembrana TRA-1-60 y TRA-1-80, todas ellas detectadas mediante IF reflejado en la **Figura 14A**. Otro método para el seguimiento de la pluripotencia de las células Las células pluripotentes es la determinación de la expresión de fosfatasa alcalina (AP), que puede ser fácilmente ensayada debido a la capacidad de esta enzima para cambiar la conformación de un reactivo colorimétrico de un estado soluble a un precipitado, generando la tinción de colonias celulares fácilmente identificables.

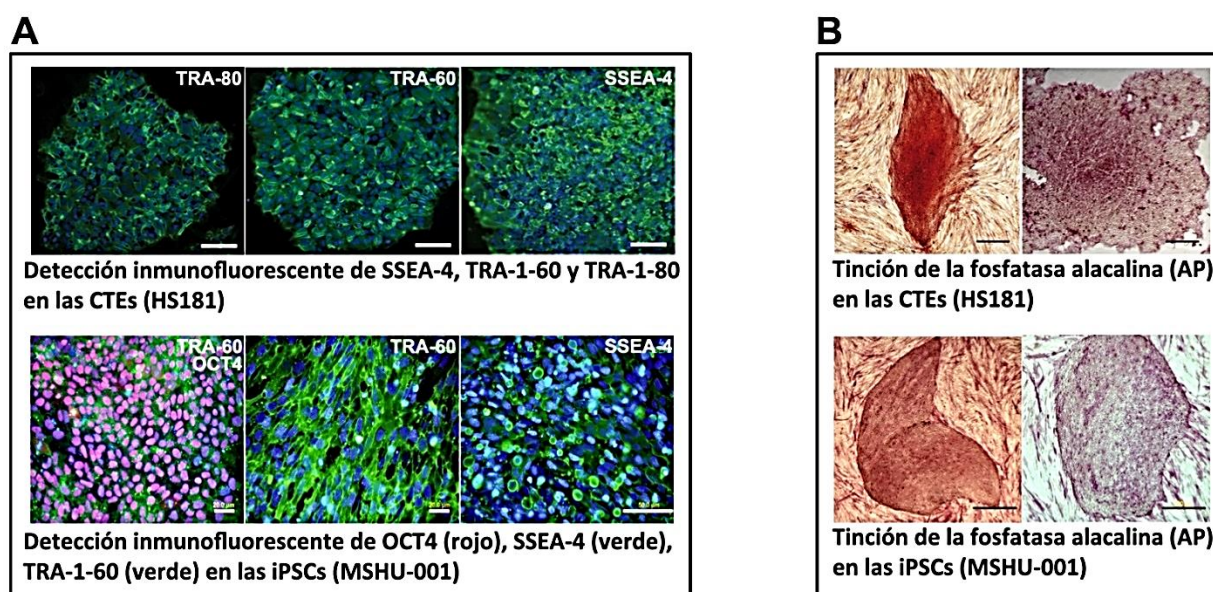


FIGURA 14. Caracterización de marcadores de superficie (SSEA-4, TRA-1-60 Y TRA-1-80) y tinción de la AP en las CTEs (HS181) e iPSCs (MSHU-001) de origen humano. Barra de escala =50 μ m.

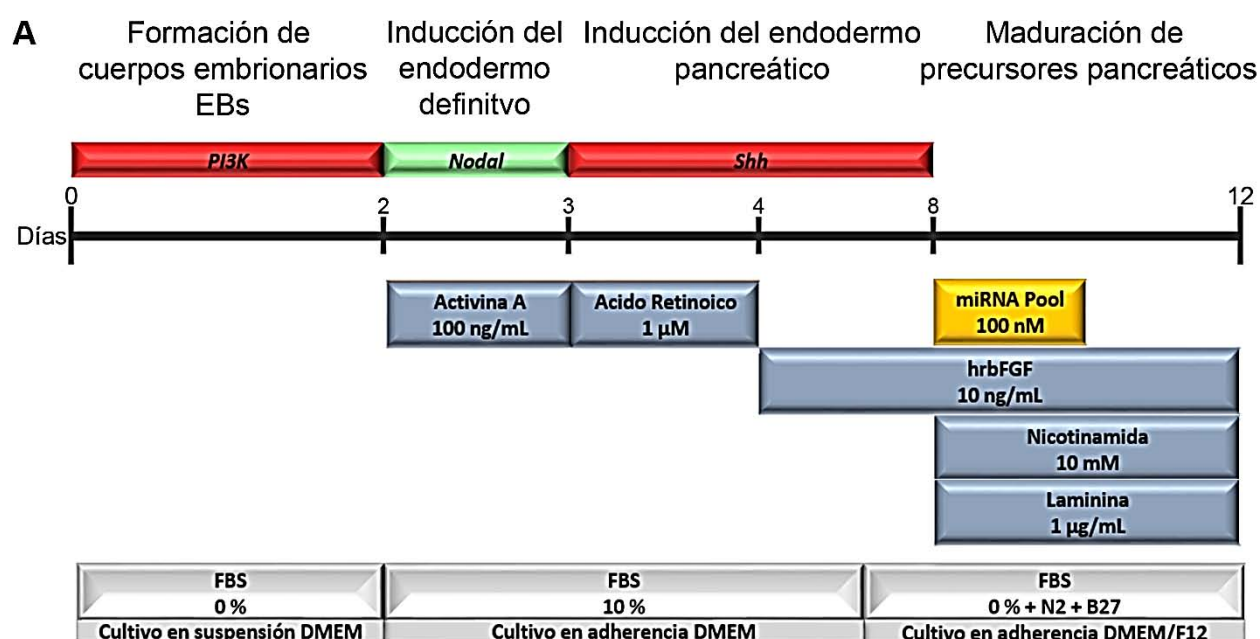
Por tanto, estos resultados de caracterización demuestran que las células pluripotentes utilizadas en nuestro estudio son mantenidas en cultivo en estado no diferenciado hasta que son expuestas a las señales apropiadas para diferenciarse. Evidenciado por una gran capacidad proliferativa y el correcto patrón de expresión de marcadores de pluripotencia que incluye marcadores nucleares (OCT4, NANOG y SOX2), marcadores de superficie (SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-80) y la tinción de la fosfatasa alcalina (AP).

4.2. El páncreas y las pequeñas moléculas de ncRNA

4.2.1. Las pequeñas moléculas de ncRNA en la diferenciación de las CTEs

Los descubrimientos realizados en los últimos años que demuestran como las pequeñas moléculas de ncRNA participan en diversos procesos de regulación génica mediante ribointerferencia con un papel clave en diversos procesos biológicos tales como proliferación celular, diferenciación y apoptosis, nos llevaron a plantearnos hasta dónde puede llegar el potencial de estas pequeñas moléculas reguladoras para dirigir programas que definen el destino y el carácter de las células durante el desarrollo. Por ello, iniciamos nuestro trabajo con la propuesta de estudiar el efecto que pueden llevar a cabo las pequeñas moléculas de ncRNAs en el proceso de diferenciación de las CTEs. Para esta primera aproximación, aislamos las pequeñas moléculas de RNA de los islotes pancreáticos murinos mediante el método descrito previamente en el **apartado 3.3**, obteniendo de esta forma un *pool* que incluía los miRNAs expresados preferencialmente en los islotes pancreáticos murinos adultos. Una vez determinada la cantidad y calidad de la muestra, se incorporó en el interior de las CTEs murinas ES-D3 mediante transfección celular. Antes de añadir la mezcla de pequeñas moléculas de ncRNA se induce la diferenciación *in vitro* de estas CTEs mediante el protocolo de diferenciación descrito previamente en el **apartado 3.2**.

La estrategia de inducción de las CTEs hacia células productoras de insulina estaba basada en la adicción de factores claves en el desarrollo pancreático resumido esquemáticamente en la **Figura 15A**. En primer lugar, las células fueron cultivadas en suspensión para la formación de los EBs constituidos por un agregado celular tridimensional que contiene células parcialmente diferenciadas mediante la técnica de gota colgante retirando del medio de cultivo el LIF. Posteriormente, los EBs fueron recogidos y cultivados en adherencia en placas tratadas con matrigel para favorecer su adhesión a la placa de cultivo y se realizó la inducción del endodermo definitivo con activina A que activa la vía de señalización Nodal en conjunción con un medio con baja concentración de FBS para inhibir la actividad de la vía de señalización PI3K, entonces el medio fue enriquecido con ácido retinoico y el bFGF para inducir el desarrollo del endodermo pancreático después de la obtención del endodermo definitivo. Por último, las células fueron maduras mediante el cultivo en medio DMEM/F12 sin suero (FBS) suplementado con N2 y B27 y adicionando laminina, bFGF y nicotinamida, produciéndose en esta etapa la transfección del *pool* de pequeñas moléculas de ncRNA extraídas de las muestras de islotes pancreáticos murinos, para evaluar su efecto en promover la maduración de los precursores pancreáticos.



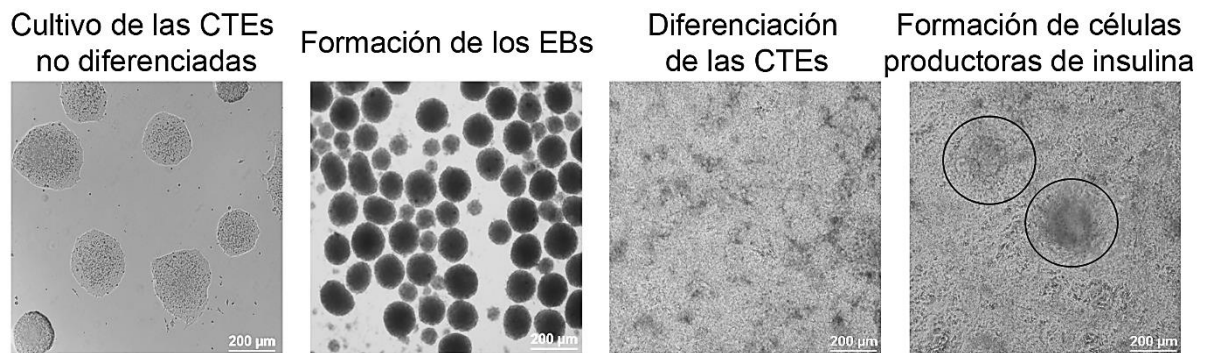
B

FIGURA 15. A) Esquema del protocolo de diferenciación de las CTEs murinas (ES-D3) hacia células productoras de insulina. Se observan las CTEs en estado no diferenciado e inducidas a formar los EBs mediante el cultivo en suspensión con la técnica de gota colgante. Después de la adicción de activina A y ácido retinoico los EBs se adhieren y forman precursores pancreáticos que se expanden en cultivo *in vitro* adicionando al medio hrbFGF. Finalmente, se induce la obtención de células productoras de insulina adicionando el medio N2, B27, nicotinamida, laminina y hrbFGF, junto con la transfección del *pool* de ncRNA de islotes pancreáticos. Las condiciones del medio de cultivo se indica en escala de grises, los factores de desarrollo en azul, las vías de señalización activadas en verde e inhibidas en rojo y la transfección de los miR-mimic (miR-7 y -375) en amarillo. B) Aspecto celular en las distintas etapas del protocolo de diferenciación donde se observa como las células comienzan a formar pequeñas agrupaciones similares a la estructura de los islotes pancreáticos. Barra de escala =200 µm.

Los cambios morfológicos durante el protocolo de diferenciación son evidentes, las células no diferenciadas crecen formando colonias esféricas bien definidas y después de ser inducidas a formar los EBs se puede observar la estructura esferoidal típica que las células forman espontáneamente cuando se cultivan en suspensión. Una vez que los EBs son fijados las células crecen ya sin formar las colonias típicas del cultivo no diferenciado y finalmente se observa en la etapa de maduración la aparición de pequeñas agrupaciones celulares, que recuerda a la distribución típica de las células beta de los islotes pancreáticos como se refleja en la **Figura 15B**.

Para estudiar el efecto del protocolo de diferenciación en la inducción de las CTEs hacia células productoras de insulina, analizamos la expresión de varios genes marcadores específicos del linaje pancreático en las células diferenciadas. La diferenciación de las CTEs murinas se evaluó en primer lugar mediante RT-PCR en las siguientes condiciones experimentales; un grupo control sometido al protocolo de diferenciación (Control), un grupo sometido al mismo protocolo de diferenciación junto con la transfección del *pool*

de miRNAs de islotes pancreáticos (miRNAs-pool), además de un grupo de CTEs no diferenciadas (LIF+) y muestras de páncreas murino (Control+). Los resultados obtenidos del análisis revelaron la expresión de marcadores génicos del desarrollo pancreático (Foxa2, Pdx1, Neurog3, Nkx6.1, Pax6 y Pax4) como se muestra en la **Figura 16**. La evaluación de expresión de genes que codifican hormonas características del páncreas endocrino identificó una clara expresión del gen de la insulina (Ins-I) característico de las células beta pancreáticas, mientras que no se detectaron marcadores del resto de hormonas pancreáticas endocrinas como son el polipéptido pancreático, somatostatina y glucagón (Ppy, Sst y Gluc). Además, se detectaron algunos marcadores tempranos típicos del páncreas exocrino (Ptf1a y Mist1), aunque no de las enzimas digestivas pancreáticas asociadas a este como la amilasa y el quimiotripsinógeno (Amy2a y Ctrb1), tal y como se refleja en la **Figura 16**.

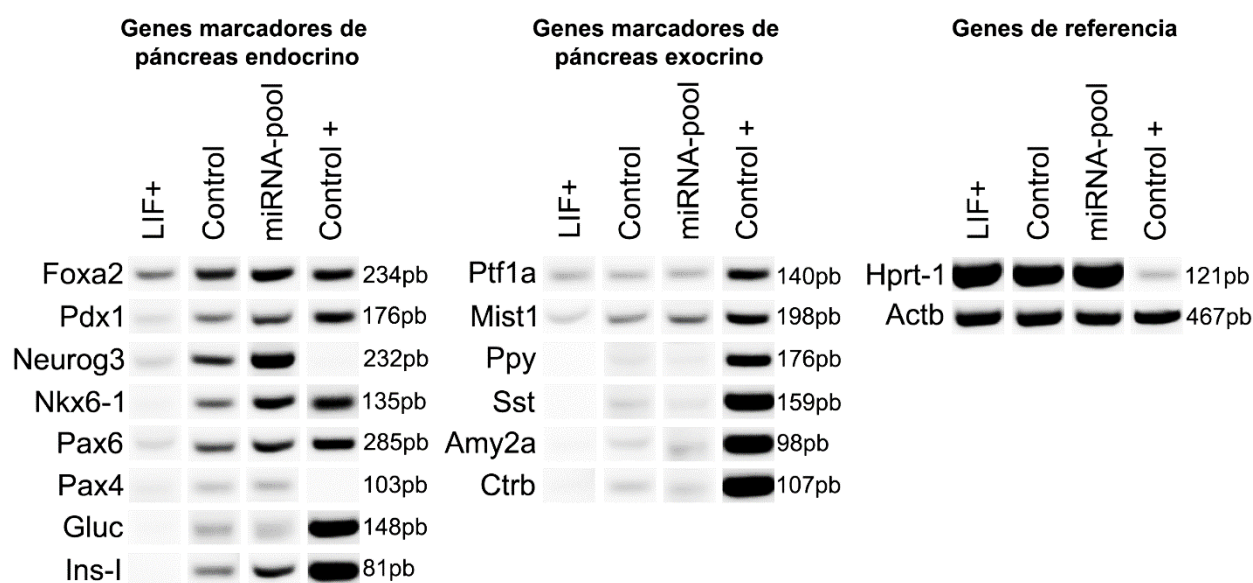


FIGURA 16. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de genes relacionados con el desarrollo pancreático al final de la inducción de la diferenciación en los diferentes grupos experimentales: CTEs no diferenciadas (LIF+); CTEs diferenciadas sin adición del *pool* de miRNAs (Control); CTEs diferenciadas con la adición del *pool* de miRNAs (miRNAs-*pool*) e islotes pancreáticos murinos (Control+). La RT-PCR fue realizada durante 30 ciclos, utilizando Hprt-1 y Actb como genes de referencia.

A continuación, se cuantificaron los cambios de expresión mediante qPCR de algunos de los marcadores génicos identificados por su relevancia en la diferenciación en los grupos

diferenciados (Control y miRNAS-pool), respecto al grupo no diferenciado (LIF+). Para analizar la producción del endodermo definitivo en primer lugar, se cuantificaron los marcadores Sox17 y Foxa2. En segundo lugar, se analizó la expresión del marcador de endodermo primitivo, Sox7 para asegurar que cualquier variación en la expresión de Sox17 y Foxa2 no procedía de un endodermo primitivo, donde estos marcadores también se pueden expresar. Se produjo una sobreexpresión de los marcadores del endodermo definitivo, Sox17 (27 veces, $p \leq 0,05$) y Foxa2 (9 veces, $p \leq 0,01$), más acusada en las células transfectadas con el *pool* de miRNAs (miRNAs-pool). En contraste, el marcador del endodermo primitivo Sox7 que mostró un leve aumento con diferencias no significativas en la expresión entre ambos grupos. Además, los valores de expresión en la qPCR son bastante elevados ($Cq > 30$), lo que sugiere que únicamente niveles basales de este gen fueron expresados. Por último, detectamos un marcado aumento significativo de expresión de varios factores de transcripción esenciales en el desarrollo pancreático, como son Pdx1 y Neurog3 (marcadores del desarrollo pancreático; 22-31 veces, $p \leq 0,01$), Pax6 y Nkx6.1 (marcadores de diferenciación endocrina; 6-33 veces, $p \leq 0,01$) y el gen de la insulina (Ins-I, marcador de células beta pancreáticas; 29 veces, $p \leq 0,05$), durante el desarrollo de nuestro protocolo de diferenciación (**Figura 17**). Por otra parte, un importante marcador de células pluripotentes como es Oct4 se expresó a niveles muy bajos apoyando la disminución de la pluripotencia de las células y un adecuado proceso de diferenciación lejos del estado no diferenciado de las células troncales. Finalmente, se midieron los niveles de Sox1 (marcador ectodermo) y Brachyury (marcador mesodermo), para determinar si existía una diferenciación preferencial hacia el linaje endodérmico (**Figura 17**). La expresión de un marcador mesodérmico como Brachyury, no aumentó apreciablemente en ninguna de las condiciones experimentales, sin embargo se observó un pequeño aumento de expresión en ambas condiciones en un marcador ectodérmico como Sox1, indicando que el protocolo no inhibió este linaje por completo.

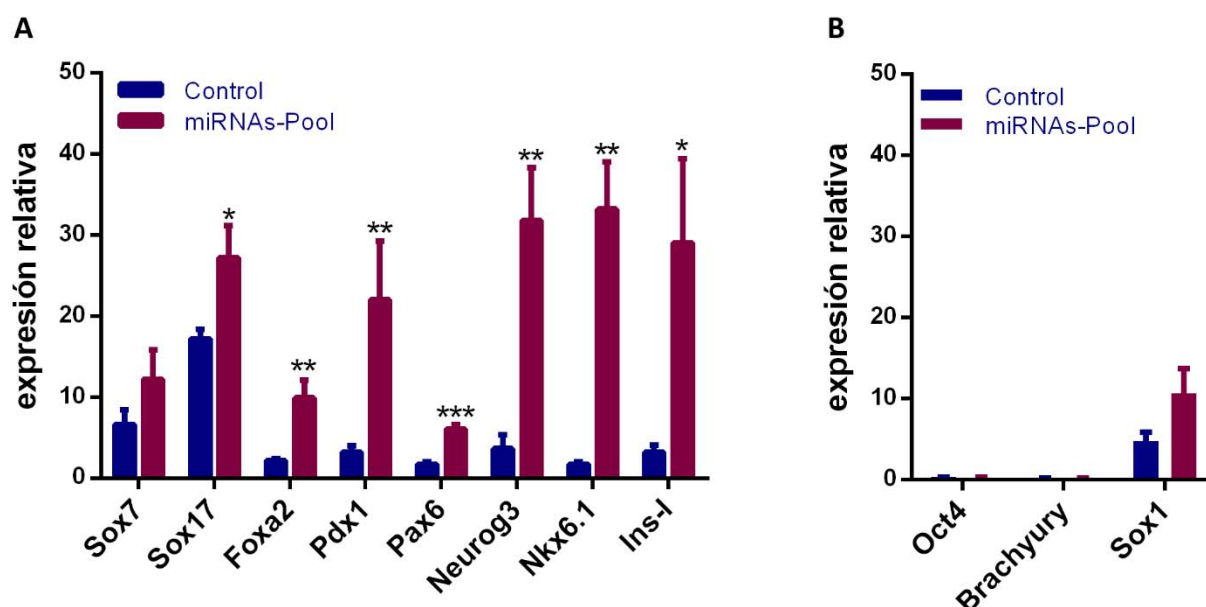


FIGURA 17. Cambios de expresión génica en las CTEs murinas (ES-D3) sometidas al protocolo de diferenciación sin adición del *pool* de miRNAs (Control) y con la adición del *pool* de miRNAs (miRNAs-*pool*). A) Marcadores génicos representativos del endodermo y páncreas. B) Marcadores génicos representativos de pluripotencia, mesodermo y ectodermo. Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01; acorde al test holm-šídák.

En conjunto estos resultados de análisis de expresión génica sugieren que el protocolo combinado con el *pool* de miRNAs mejora la inducción de la diferenciación hacia el endodermo definitivo y progenitores endocrinos a partir de las CTEs murinas. Sin embargo, la inducción no parece ser totalmente preferencial hacia el linaje endodérmico tal y como esperábamos conseguir.

En cualquier caso, para evaluar el estado de funcionalidad de las células obtenidas al final del protocolo de diferenciación procedimos a analizar si la secreción de insulina de las CTEs diferenciadas podría ser estimulada por glucosa. Las células después de la última etapa del protocolo de diferenciación fueron lavadas con PBS y estabilizadas durante 1 hora con solución de Krebs-Ringer en ausencia de glucosa. A continuación, se incubaron las células en solución de Krebs-Ringer con diferentes concentraciones de glucosa 2,7, 10 y 20 mM secuencialmente durante 1 hora a 37°C, recolectándose el medio para su análisis. Para determinar si las células inducidas respondían a la estimulación con glucosa, la liberación de insulina en células no diferenciadas y

diferenciadas fue determinada mediante ELISA en respuesta a las diferentes concentraciones de glucosa (2,7-20 mM). Las células diferenciadas espontáneamente al retirar del medio de cultivo el LIF (LIF-), no responden a la estimulación y solo se observa una liberación de insulina basal independiente de la presencia o ausencia de glucosa. Mientras que en las células diferenciadas a baja concentración de glucosa (2,7 mM), ya se observó una liberación de insulina que fue aproximadamente 4 veces mayor ($p \leq 0,05$) en las células diferenciadas sin transfectar (Control) y 6 veces mayor ($p \leq 0,05$) en las células diferenciadas transfectadas con los miRNAs (miRNAs-pool) respecto a las células diferenciadas espontáneamente (LIF-). Las células no transfectadas (Control) aunque manifiestan una respuesta inicial a bajas concentraciones de glucosa, no respondieron a un incremento en la concentración de glucosa (10 mM), mientras que en las células transfectadas (miRNAs-pool) si aumento la liberación de insulina significativamente hasta 10 veces ($p \leq 0,05$), sin embargo con altas concentraciones de glucosa (20 mM) parece que las células no resistieron las condiciones y no pudieron responder al estímulo como podría hacerlo una célula beta pancreática totalmente funcional como podemos observar en la **Figura 18**.

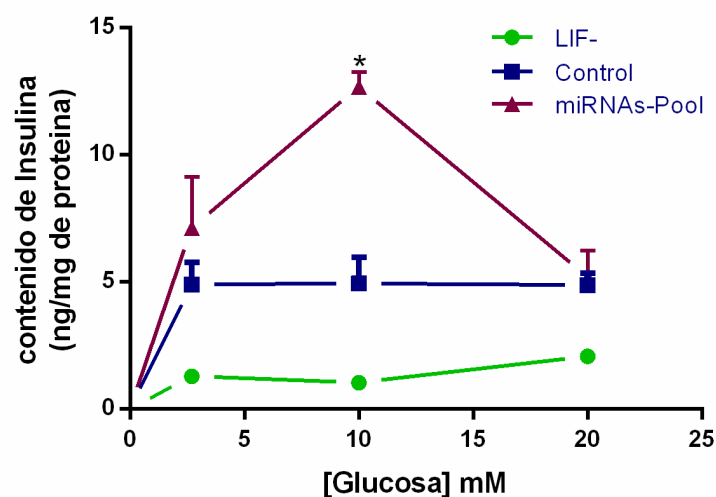


FIGURA 18. Secreción de insulina frente a la estimulación con glucosa (2,7-20 mM) durante 1 hora en las células obtenidas al final del proceso de diferenciación: CTEs diferenciadas espontáneamente (LIF-); CTEs sometidas al protocolo de diferenciación sin adición del *pool* de miRNAs (Control); CTEs con la adición del *pool* de miRNAs (miRNAs-pool). Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; * $p \leq 0,05$; acorde al test holm-šídák.

Por tanto, parece que los miRNAs pueden constituir candidatos para mejorar las estrategias de diferenciación actuales para obtener células productoras de insulina maduras a partir de las CTEs *in vitro*. Por lo que, nos propusimos profundizar en el estudio de la implicación de los miRNAs en el desarrollo pancreático y determinar su efecto en los procesos de diferenciación. Esta primera aproximación con las pequeñas moléculas de ncRNA específicas de los islotes pancreáticos, apoyó nuestra hipótesis de trabajo en la regulación que pueden ejercer los miRNAs en los procesos de diferenciación de las CTEs a nivel post-transcripcional, clave para controlar la coordinación de la expresión génica. Por ello, para profundizar en el estudio del papel que los miRNAs pueden ejercer en este control, nos propusimos analizar el patrón de expresión diferencial de los miRNAs durante el proceso de diferenciación de las CTEs humanas hacia células productoras de insulina.

4.2.2. Expresión de los miRNAs característicos del páncreas

Ya se ha demostrado que muchos miRNAs muestran patrones de expresión temporal y específica de tejidos, desestabilizando diversos procesos de transcripción génica para definir aún más los perfiles de transcripción específicos de tejidos. El análisis funcional puede ser corrompido por el estudio de interacciones entre miRNAs y mRNAs diana que no se expresan en el tejido considerado, por ello analizamos la expresión diferencial de miRNAs en diversos tejidos humanos (páncreas, corazón, riñón, hígado, pulmón y cerebro), para ello recurrimos a la base de datos de expresión de miRNAs (<http://www.microrna.org>), que nos proporciona un amplio conjunto de datos sobre la expresión de los miRNAs y la predicción de mRNAs diana derivado de un amplio proyecto de secuenciación de un gran conjunto de tejidos de mamíferos y líneas celulares de origen animal, como podemos observar en la **Figura 19** cada tejido presenta un perfil de expresión de miRNAs característico.

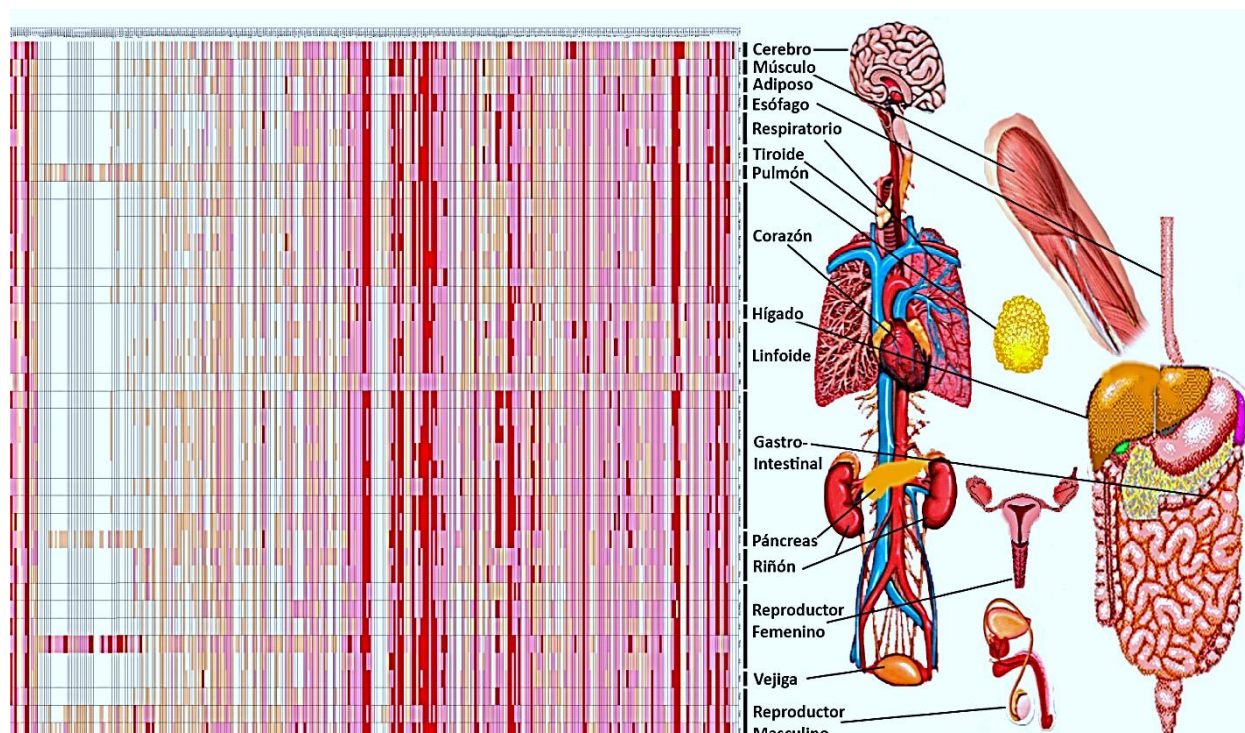


FIGURA 19. Base de datos de expresión de miRNAs en los tejidos del organismo. La escala en gradiente de color representa los valores de expresión de un perfil específico de miRNAs en los tejidos del organismo, en las columnas se representa el nivel de expresión de los miRNAs y en las filas los diferentes tejidos.

El análisis de los resultados nos permitió identificar el subconjunto de miRNAs expresados abundantemente y de forma preferente en cada tejido. El páncreas presenta un subconjunto o grupo de miRNAs que se puede asociar con la adquisición y el mantenimiento del fenotipo pancreático entre los podemos destacar miR-7, -15a, -16, -26a, -29a/b/c, -30d, -124, -148a, -214, -200a/c, -375 y -376a (**Figura 20A**). Para comprobar la correlación entre el subconjunto de miRNAs pancreáticos identificado en la base de datos y los miRNAs expresados en nuestra muestra del *pool* de miRNAs de islotes pancreáticos utilizadas para la transfección de las CTEs murinas descrita anteriormente, se analizó la expresión diferencial de miRNAs entre dicha muestra del *pool* de islotes pancreáticos y un nuevo *pool* generado a partir de muestras de corazón murino mediante qPCR. Este análisis reveló que el miRNA con mayor expresión en las muestras pancreáticas fue miR-375, seguido de las familias miR-29 (miR-29a/b/c) y miR-200 (miR-200a/c) y también destaca la expresión de miR-7, -15a, -148a y -214. Sin embargo, a diferencia de los niveles de expresión reflejados por la base de datos para

los miRNAs pancreáticos donde destaca miR-124, los resultados de qPCR no evidenciaron expresión de este miRNA en el *pool* de miRNAs transfectados como podemos observar en la **Figura 20B**.

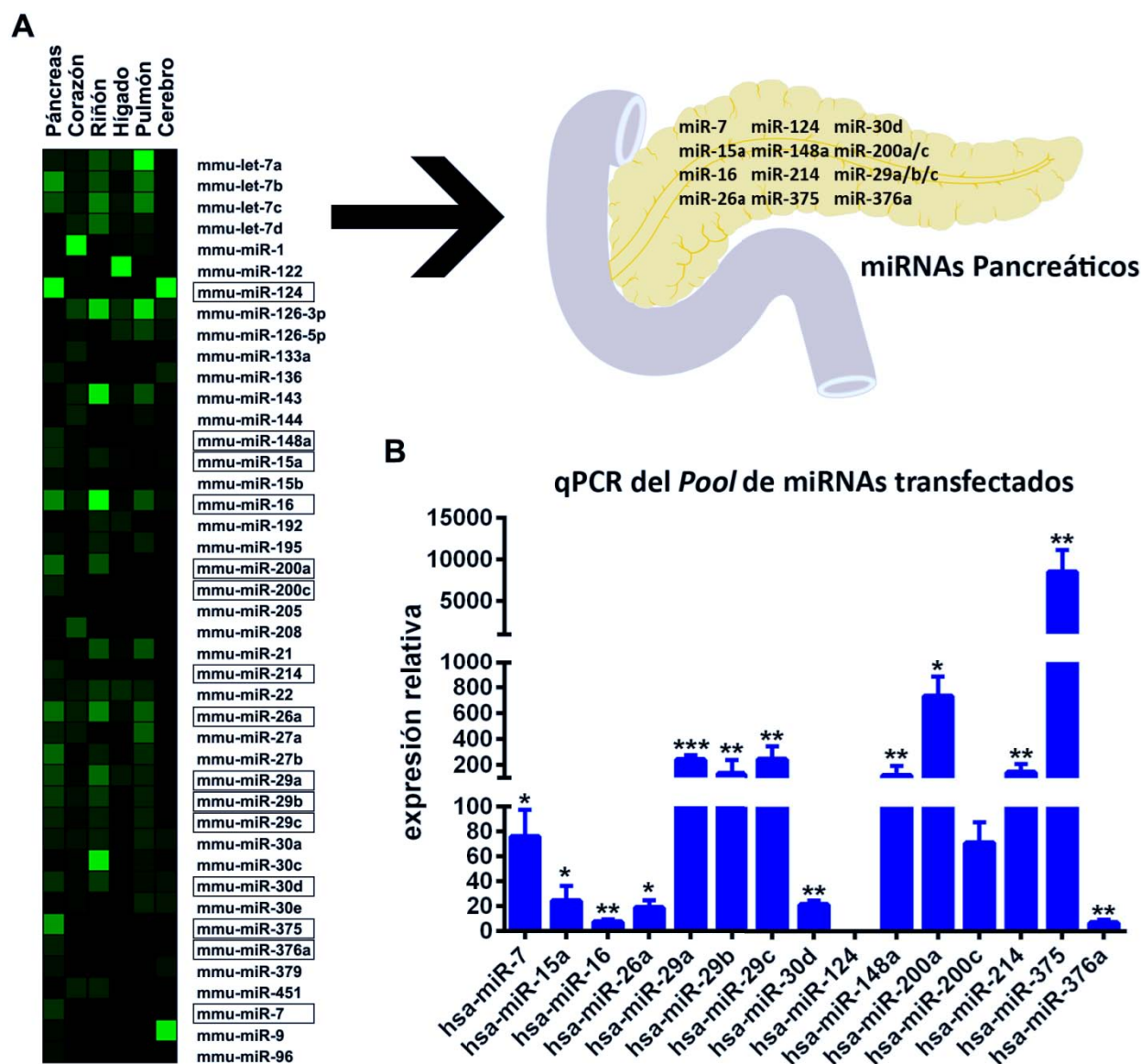


FIGURA 20. A) La base de datos de expresión de miRNAs revela un conjunto de miRNAs con una expresión preferentemente pancreática. B) Análisis mediante qPCR del *pool* de miRNAs pancreáticos utilizado en la transfección de las CTEs frente a un pool de miRNAs de muestras de corazón murino. Los valores son mostrados (media±SEM). n=3; *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001; acorde al test holm-šidák.

4.3. Análisis de miRNAs en la diferenciación de las CTEs

4.3.1. Diferenciación de las CTEs hacia células productoras de insulina

Con el objetivo de estudiar el patrón de expresión de miRNAs característicos de las CTEs en diferenciación hacia células productoras de insulina, utilizamos el protocolo CABIMER de diferenciación en las CTEs humanas (HS181) establecido en nuestro laboratorio. Este protocolo ha sido descrito en detalle previamente en el **apartado 3.2** y pretende simular las etapas del desarrollo pancreático *in vivo* instruyendo a las CTEs a través de cada etapa intermedia del desarrollo endodérmico, similar a lo que ocurre durante el desarrollo pancreático (endodermo definitivo, endodermo del intestino primitivo, endodermo pancreático y precursores endocrinos), mediante la combinación de diferentes factores de crecimiento que activen o inactiven secuencialmente las vías de desarrollo adecuadas, como se observa esquematizado en la **Figura 21**.

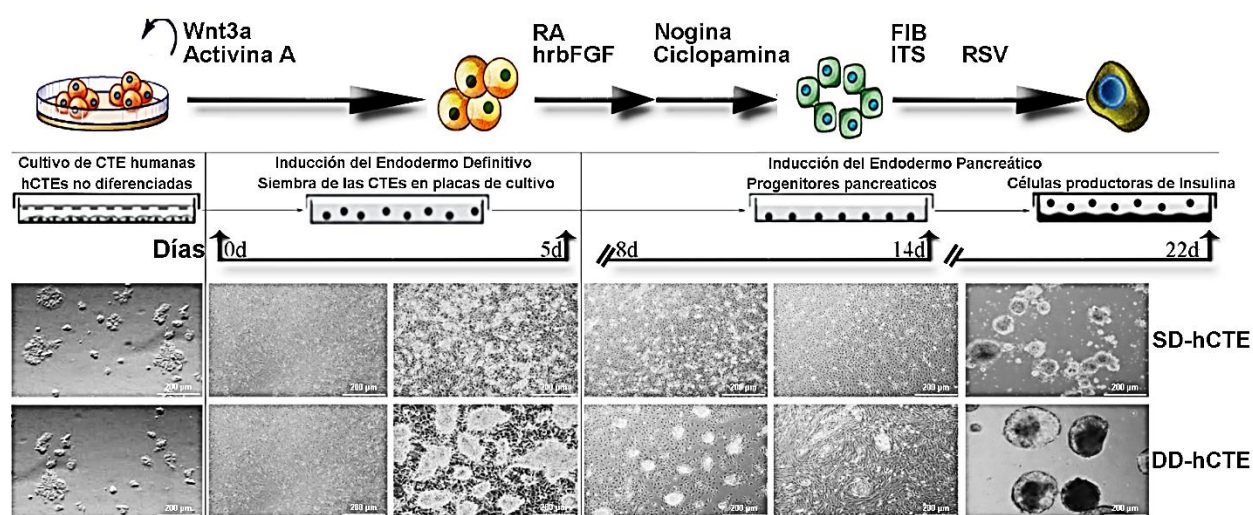


FIGURA 21. Esquema de las etapas requeridas para la diferenciación de las CTEs humanas (HS181) en células productoras de insulina, junto con imágenes de microscopio representativas de las diferentes etapas. Representación esquemática del protocolo de diferenciación dirigida basado en la activación secuencial de vías de señalización durante el desarrollo, induciendo la diferenciación de las CTEs humanas (HS181) hacia un destino de célula beta pancreática. Barra de escala =200 µm.

Al final de este protocolo de diferenciación para comprobar su efectividad, analizamos la expresión de genes asociados a la pluripotencia, marcadores de linaje embrionario

(ectodermo, mesodermo y endodermo) y marcadores pancreáticos mediante qPCR, como se puede observar en la **Figura 22**. En primer lugar, la expresión de los genes de pluripotencia *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* sufrieron una rápida inhibición significativa a día 5 tanto en las células diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE) como en las células diferenciadas con el protocolo CABIMER (DD-hCTE) respecto a las CTEs no diferenciadas, indicativo de la rápida salida del estado no diferenciado de las células. A continuación, para evaluar la posible formación inespecífica de células provenientes de linajes embrionarios no deseados (ectodermo y mesodermo), se evaluó la expresión de marcadores ectodérmicos (*SOX1*) y mesodérmicos (*FLK1*, *BRACHYURY*), los cuales no presentaban un aumento de expresión significativo en las células sometidas al protocolo de diferenciación CABIMER (DD-hCTE), sin embargo las células diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE) sí que mostraron un aumento significativo de los niveles de expresión de *SOX1*, *FLK1* y *BRACHYURY*.

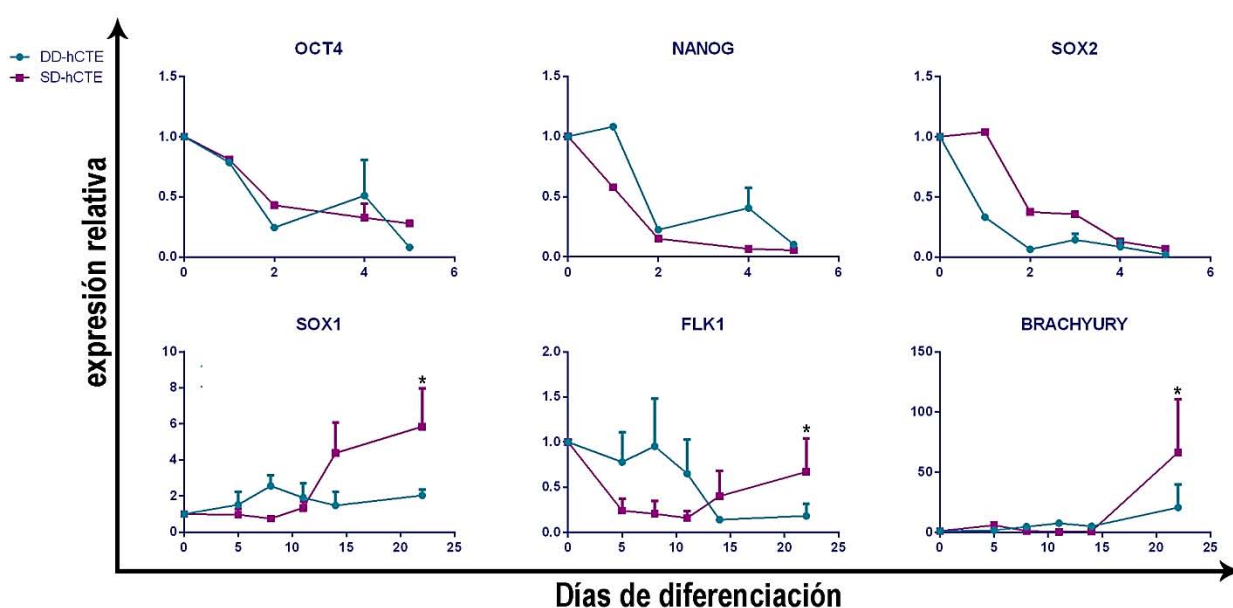


FIGURA 22. Inducción de la diferenciación *in vitro* de las CTEs humanas (HS181), mediante el protocolo CABIMER. Las CTEs fueron diferenciadas a células productoras de insulina (DD-hCTE) o diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE). Se analizaron marcadores de genes de pluripotencia, ectodermo y mesodermo mediante qPCR. Los valores de expresión relativa de los genes detectados (calculadas a partir de los valores de Ct normalizados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$), asumiendo como muestra de referencia las CTEs no diferenciadas y RPLP como gen normalizador. Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=6; *p \leq 0,05 acorde al test holm-šídák.

Con el objetivo de validar si las células diferenciadas mediante el protocolo CABIMER (DD-hCTE) podrían estar comprometidas con la ruta de diferenciación endodérmica, se analizó la expresión de genes diferencialmente expresados que constituyen marcadores del endodermo definitivo durante la primera etapa del protocolo. Esta se caracteriza por condiciones de cultivo con baja concentración de suero (FBS) para inhibir la activación de la vía de señalización PI3K y la adición combinada de factores esenciales como la activina A activador de la vía de señalización Nodal y el Wnt3a activador de la vía de señalización Wnt, para inducir la formación del mesendodermo con el objetivo final de obtener el endodermo definitivo, reflejado en un aumento significativo de los niveles de expresión de *SOX17*, *GSC* y *HNF3B* (*FOXA2*), dando lugar a una población de células *GSC⁺/SOX17⁺/HNF3B⁺* característica del endodermo definitivo.

El proceso de diferenciación prosiguió hacia el endodermo pancreático inducido mediante la adición progresiva de suero (FBS, 0-5%) y la retirada de la activina A del cultivo a los 5 días, reflejado en un aumento de expresión significativo de marcadores génicos como *HNF1B* y *HNF4α*, además *NEUROG3* un regulador esencial de la diferenciación celular endocrina pancreática con sus dianas *NEUROD1* y *NKX2.2* fue transitoriamente inducido en esta población celular, aunque su expresión fue inhibida rápidamente impidiendo la inducción prematura del programa pancreático endocrino.

La adición combinada del hrbFGF, inductor del fenotipo pancreático y el ácido retinoico un potente morfógeno inductor de la diferenciación durante 3 días permite inhibir la vía de señalización Shh, dando lugar a la inducción del programa pancreático. Por tanto, para inducir la formación de los precursores endocrinos *in vitro*, las células fueron tratadas secuencialmente durante 6 días en total con los factores nogina para inhibir la vía de señalización Bmp (3 días) y ciclopamina que fortalece la inhibición de la vía de señalización Shh (3 días), obteniéndose un desarrollo endocrino preferente a expensas de otros derivados endodérmicos. Las células manifestaron un aumento significativo de la expresión de *PAX6*, *NKX2.2* y *PDX1*, este último un factor esencial para el desarrollo

del páncreas y la formación de las células beta pancreáticas, generándose una población celular resultante de progenitores pancreáticos fácilmente identificable por la expresión *NKX2.2⁺/PAX6⁺/PDX1⁺*.

La última etapa, se caracteriza por el cultivo de las células en suspensión induciendo la formación de agregados celulares similares a los *cluster* de los islotes pancreáticos, constituyéndose una estructura tridimensional importante en la inducción de células maduras funcionales productoras de insulina a partir de las CTEs.

Además, para complementar este proceso de maduración durante esta etapa final de cultivo en suspensión se proporcionó al medio una mezcla de factores constituida por insulina, transferrina, selenio y fibronectina durante 6 días, suplementada con resveratrol los últimos 2 días, cuyo objetivo es la maduración de la población *NKX2.2⁺/PAX6⁺/PDX1⁺* obtenida previamente, diferenciándose en células que expresan específicamente insulina, pero no otras hormonas pancreáticas, tales como glucagón y somatostatina. En primer lugar, observamos como la etapa de maduración reactiva la expresión de *NEUROG3* acompañado de un aumento significativo en la expresión de varios marcadores que constituyen reguladores transcripcionales importantes para determinar la identidad de células endocrinas con una expresión restringida a las células beta como son *NEUROD1*, *NKX6.1* y *MAFA* y además, se observó un aumento de expresión significativo de algunos de los marcadores clásicos de células beta de los islotes pancreáticos que incluyen a la insulina (*INS*) y un transportador de glucosa (*GLUT2*) requerido para la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en la última etapa del protocolo de diferenciación.

El análisis de expresión diferencial de los genes específicos de endodermo y páncreas resumido, entre los grupos celulares DD-hCTE y SD-hCTE, puede ser visualizado a continuación con más detalle en la **Figura 23**.

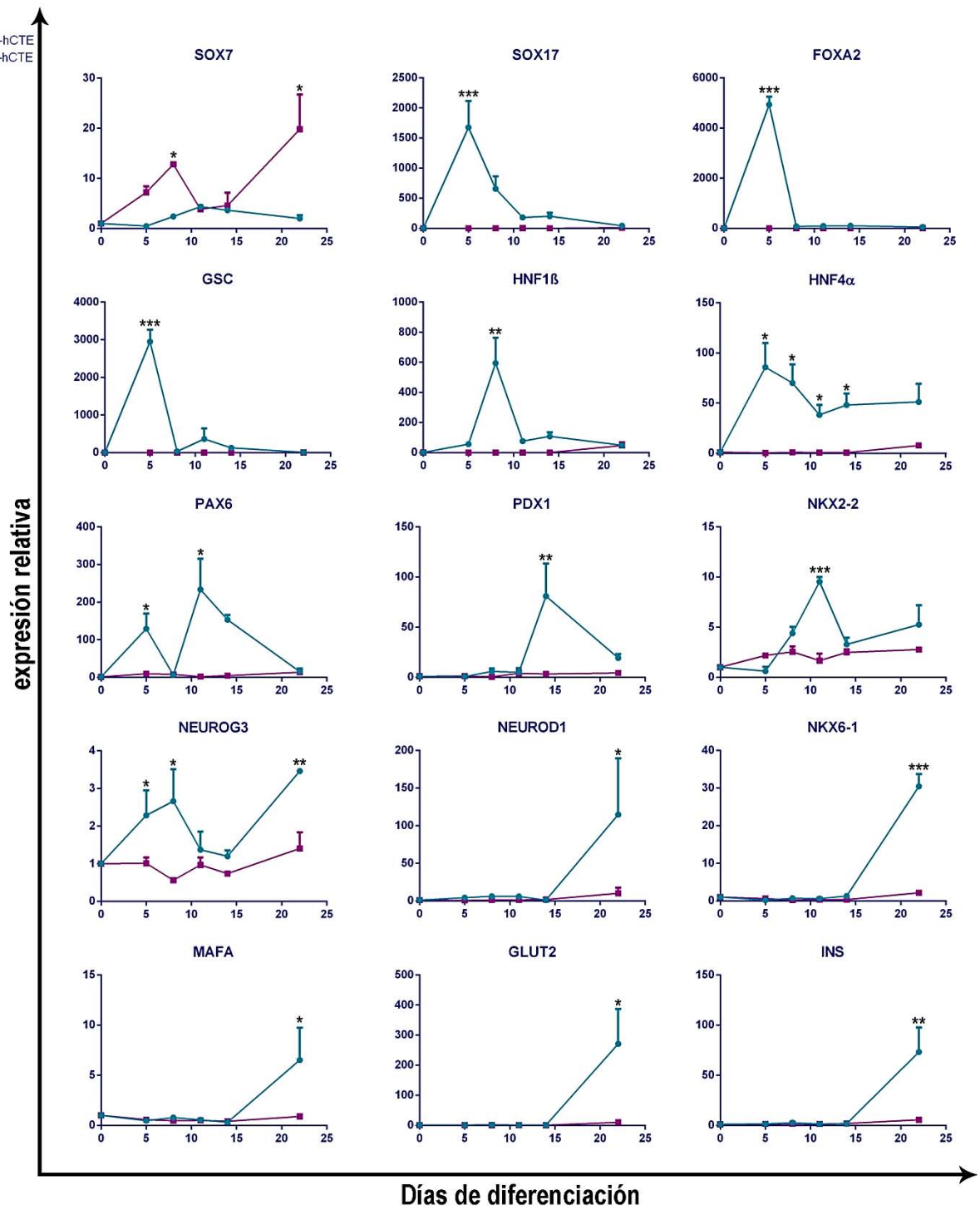


FIGURA 23. Inducción de la diferenciación *in vitro* de las CTEs humanas (HS181), mediante el protocolo CABIMER. Las CTEs fueron diferenciadas a células productoras de insulina (DD-hCTE) o diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE). Se analizaron marcadores de genes del desarrollo endodérmico y pancreático mediante qPCR. Los valores de expresión relativa de los genes detectados (calculadas a partir de los valores de Ct normalizados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$), asumiendo como muestra de referencia las CTEs no diferenciadas y RPLP como gen normalizador. Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=6; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001 acorde al test holm-šidák.

La detección de las proteínas FOXA2, PDX1, PÉPTIDO-C e INSULINA en las CTEs diferenciadas *in vitro* (**Figura 24**) confirmaron los resultados de expresión transcripcional obtenidos mediante qPCR. En las primeras etapas se observó una expresión generalizada en el cultivo de un marcador temprano del endodermo definitivo como FOXA2 (días 5-8), posteriormente se generaron colonias celulares positivas para un marcador esencial en el desarrollo pancreático como PDX1 (días 11-22) y en las últimas etapas la colocalización de INSULINA y PÉPTIDO-C (días 14-22) revela la síntesis de insulina por colonias de células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs.

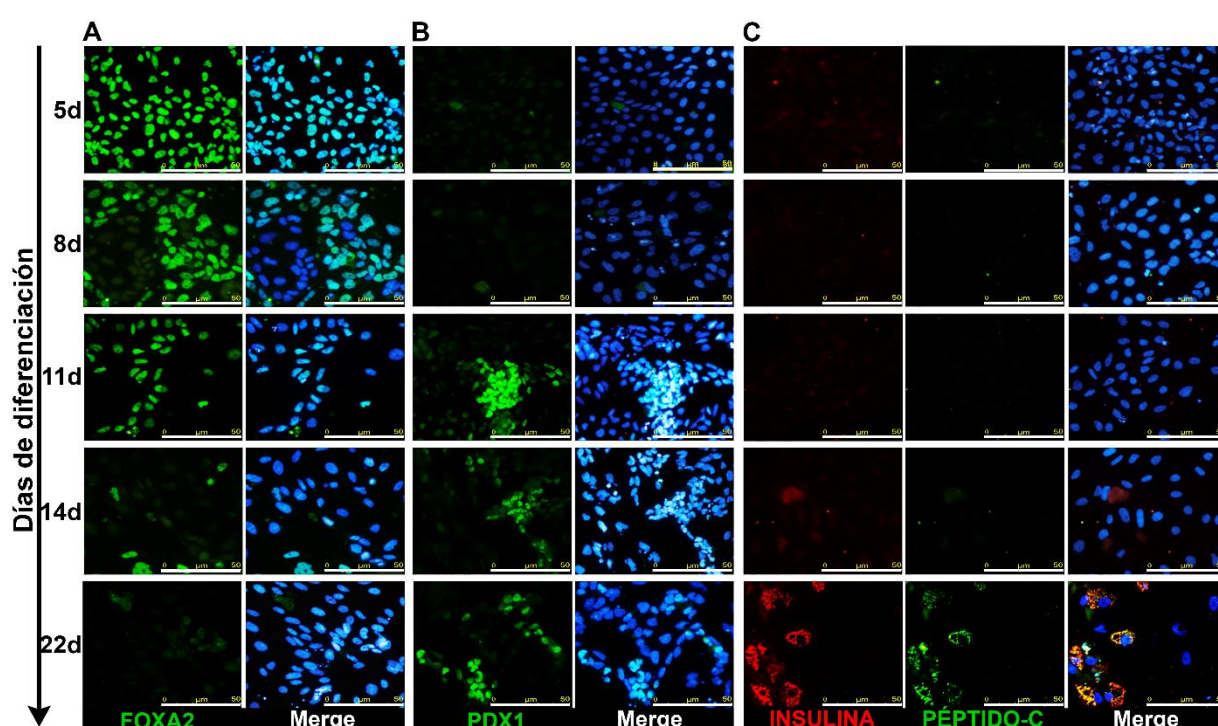


FIGURA 24. Detección mediante IF durante el proceso de diferenciación de marcadores de células y progenitores pancreáticos para la determinación de células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs (HS181) en estadios tempranos, intermedios y avanzadas del proceso de diferenciación. A) FOXA2 (verde) en las células diferenciadas hacia el endodermo definitivo en la etapa temprana. B) PDX1 (verde) en células comprometidas a progenitores pancreáticos en la etapa intermedia. C) INSULINA (rojo) y PÉPTIDO-C (verde) en *cluster* similares a islotes pancreáticos en la etapa avanzada de diferenciación. Barra de escala =50 µm.

Por tanto, estos datos confirman la obtención de células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs mediante el protocolo CABIMER de diferenciación y nos proporciona la base de estudio de expresión de los miRNAs durante el proceso de diferenciación.

4.3.2. Perfil de expresión de los miRNAs en las CTEs

Los cambios de expresión de los miRNAs antes y después del proceso de diferenciación de las CTEs, se llevó a cabo mediante un microarray de expresión de miRNAs. Con el fin de ampliar el conocimiento de las bases moleculares durante la inducción pancreática realizamos un ensayo de microarray de expresión que nos permitiera profundizar aún más en los cambios moleculares en las CTEs (HS181) durante las etapas de diferenciación. Como se refleja en la **Figura 25** se incluyeron 29 muestras en el experimento para cuantificar los cambios del nivel de expresión de los miRNAs. Las diferentes condiciones experimentales fueron constituidas por 6 muestras por grupo para formar 3 *pool* o conjuntos de muestras, los cuales fueron hibridados en 2 *arrays* y además 3 réplicas biológicas con el objetivo de reducir la variabilidad biológica, mientras que para las muestras control de tejido pancreático se utilizaron al menos 2 muestras por grupo formando un único *pool*. Por tanto, las muestras de RNA para el análisis fueron obtenidas a partir de CTEs humanas no diferenciadas (CTE_NoDif); CTEs humanas diferenciadas hacia células productoras de insulina con la adición de resveratrol (CTE_ProtCABIMER); CTEs humanas diferenciadas hacia células productoras de insulina sin la adición de resveratrol (CTE_ProtDif); CTEs humanas diferenciadas espontáneamente (CTE_DifEsp); Páncreas e Islotes pancreáticos.

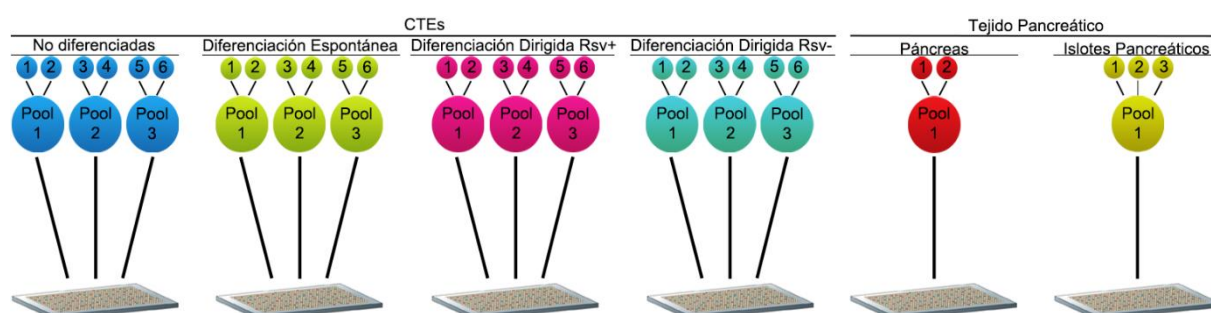


FIGURA 25. Esquema del diseño del experimento del microarray de expresión de miRNAs en las CTEs humanas (HS181). CTEs no diferenciadas (CTE_NoDif); CTEs diferenciadas espontáneamente (CTE_DifEsp); CTEs diferenciadas hacia células productoras de insulina con (RSV+, CTE_ProtCABIMER) y sin (RSV-, CTE_ProtDif) la adición final de resveratrol; Páncreas e Islotes pancreáticos.

La finalidad de este análisis fue evaluar la expresión de los miRNAs durante la diferenciación en las CTEs hacia células productoras de insulina y compararlo con el patrón de expresión en páncreas y más específicamente en los islotes pancreáticos. Un total de 2.689 ensayos de hibridación fueron empleados para la detección de 850 miRNAs humanos. Para caracterizar la expresión de los miRNAs que pudieran estar implicados en el desarrollo pancreático, en primer lugar llevamos a cabo una comparación general de la expresión de los miRNAs entre muestras de RNA total del páncreas e islotes pancreáticos, y las CTEs no diferenciadas (CTE_NoDif) y diferenciadas (CTE_ProtCABIMER y CTE_ProtDif) después del cultivo durante 22 días para determinar si el perfil de expresión difiere entre ellos e identificar grupos de miRNAs característicos de cada población celular.

Se emplearon técnicas de *clustering* o agrupación jerárquica para agrupar los miRNAs con patrones de expresión relacionados (filas) y las diferentes muestras (columnas), usando la distancia euclídea al cuadrado como medida de similitud (**Figura 26**). Basándonos en el agrupamiento jerárquico de nuestros datos de expresión los resultados revelaron distintos agrupamientos con un diverso perfil de expresión. La agrupación reveló que el patrón de expresión más próximo y por tanto con mayor nivel de similitud al tejido pancreático, fueron las muestras CTE_ProtCABIMER (Pezzolla et al., 2015), como se observa en la **Figura 26**. El análisis de los agrupamientos de expresión de páncreas e islotes pancreáticos con diferencias significativas respecto a las células obtenidas con el protocolo CABIMER, reveló un conjunto de miRNAs expresados preferentemente en las muestras pancreáticas que incluye 86 miRNAs entre los que destacaron miR-7, -21, -16, -23b, -34a, -148a, -375 y -720, así como las familias let-7, miR-15, -29, -30 y -200 con una expresión preferencial de algunos de ellos en los islotes pancreáticos (let-7a, miR-7, -16, -148a, -375 o la familia miR-30), mientras que otros miRNAs relacionados con la pluripotencia como varios miembros de la familia miR-302, esenciales para el mantenimiento de la autorrenovación de las CTEs fueron reprimidos.

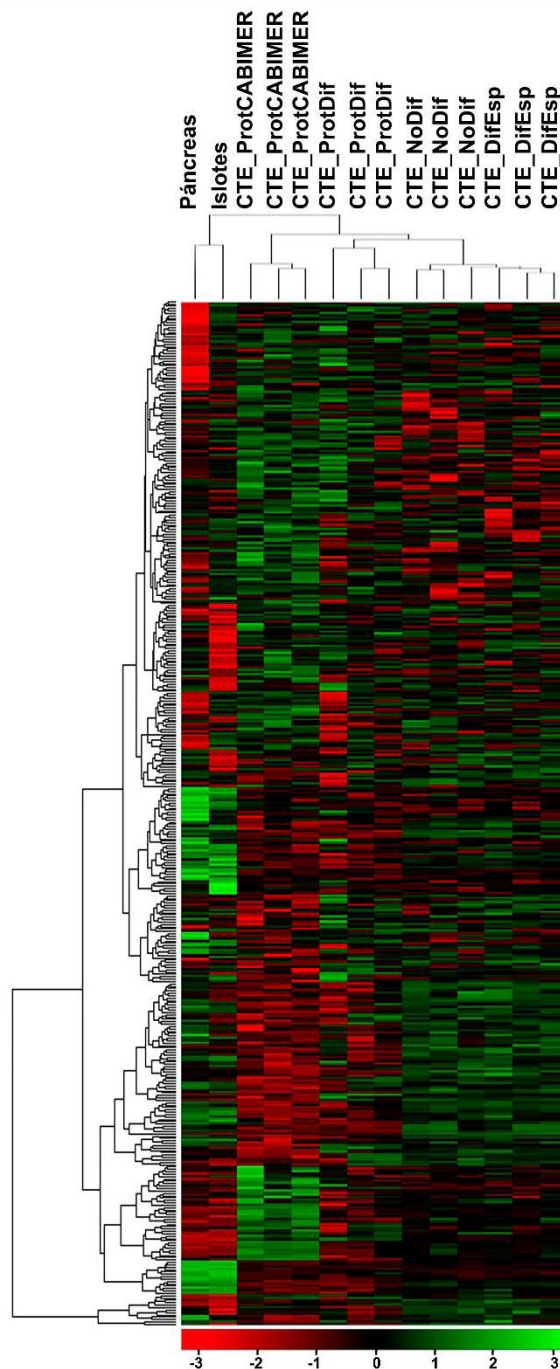


FIGURA 26. Análisis del microarray de expresión de las CTEs humanas (HS181) diferenciadas hacia células productoras de insulina mediante el protocolo CABIMER. El *heatmap* resume el patrón de expresión de miRNAs expresados diferencialmente en las muestras de RNA total de las CTEs: CTEs diferenciadas con el protocolo CABIMER (CTE_ProtCABIMER); CTEs diferenciadas espontáneamente (CTE_DifEsp); CTEs diferenciadas sin adición de resveratrol (RSV) (CTE_ProtDif); CTEs no diferenciadas (CTE_NoDif) y muestras de RNA total del páncreas e islotes pancreáticos humanos adultos. Elevada expresión es indicada en verde, mientras que baja expresión es indicado en rojo. El agrupamiento jerárquico de los miRNAs identificados está basado en su perfil de expresión usando el software MeV (distancia media de asociación y distancia euclídea fueron usados como medidas de similitud). La escala en gradiente de color, representa los valores de expresión normalizados expresados de forma logarítmica ($\log_2 > 1$; $n=3$, $p \leq 0,05$).

Posteriormente se analizaron en detalle los patrones de expresión de los miRNAs entre las muestras pancreáticas humanas (Páncreas e Islotes) y las CTEs diferenciadas hacia un linaje pancreático mediante el protocolo CABIMER (CTE_ProtCABIMER), las cuales mostraron el mayor nivel de similitud en el análisis previo, para identificar los miRNAs comunes y característicos de cada grupo.

Teniendo en cuenta que la abundancia de un miRNA determinado es un buen indicador de una función biológica específica, nuestros resultados tal y como se indica en la **Figura 27**, sugirieron que algunos miRNAs preferentemente expresados en las CTEs conllevarían un papel potencial en la autorrenovación y mantenimiento de la pluripotencia (*Cluster 5 y 6*), mientras que otros miRNAs presentaron una expresión predominante en los islotes pancreáticos y es posible que este conjunto pueda estar implicado en su desarrollo y funcionamiento (*Cluster 1*). El agrupamiento resultante mostro que las muestras del páncreas e islotes pancreáticos presentan una ligera similitud con las CTEs diferenciadas (*Cluster 2, 3, 4 y 7*), sugiriendo que estas células ya comienzan a adquirir propiedades cercanas a las de células productoras de insulina. En las CTEs diferenciadas a células productoras de insulina mediante el protocolo CABIMER de diferenciación (CTE_ProtCABIMER) se identificó un total de 187 miRNAs diferencialmente expresados de forma significativa respecto a los islotes pancreáticos (0,58 veces; $p \leq 0,05$) de los cuales 118 fueron sobreexpresados y 69 inhibidos.

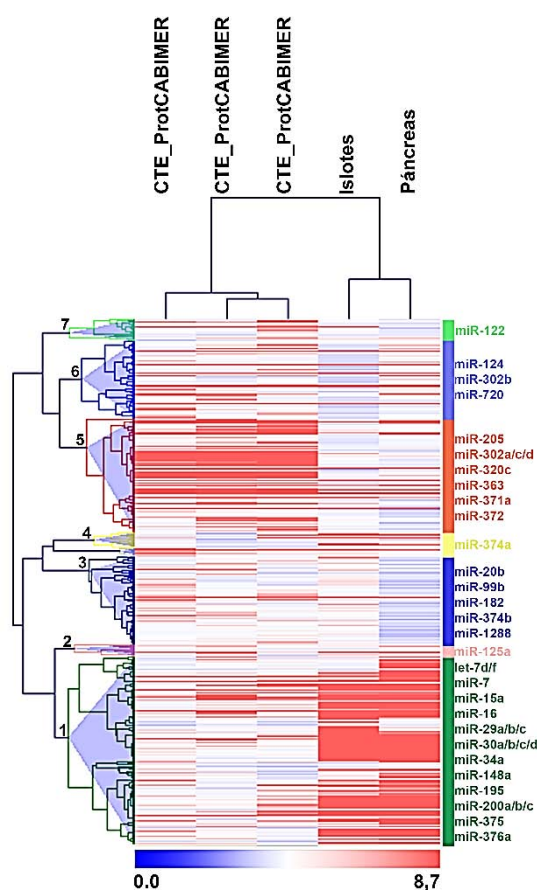


FIGURA 27. *Heatmap* del nivel de expresión de los miRNAs entre las CTEs humanas (HS181) diferenciadas con el protocolo CABIMER (CTE_Prot.CABIMER) y muestras control de páncreas e islotes pancreáticos humanos adultos. Elevada expresión es indicada en rojo, mientras que baja expresión es indicado en azul. El agrupamiento jerárquico de los miRNAs identificados está basado en su perfil de expresión usando el software MeV (distancia media de asociación y distancia euclídea fueron usados como medidas de similitud). La escala en gradiente de color, representa los cambios significativos de los valores de expresión normalizados, expresados de forma logarítmica ($\log_2 > 1$; $p \leq 0,05$).

Con el objetivo de determinar los posibles miRNAs que podían estar contribuyendo a la activación de programas de expresión génica del endodermo pancreático, comparamos el perfil de expresión de miRNAs entre los grupos CTE_ProtCABIMER y CTE_DifEsp (**Figura 28**). Analizando 850 miRNAs encontramos que 122 de ellos mostraron cambios de expresión significativos (0,58 veces; $p \leq 0,05$) durante la diferenciación de las CTEs. De esos, 39 fueron sobreexpresados y 83 inhibidos en CTE_ProtCABIMER. Encontramos que varios de los miRNAs inhibidos pertenecen a un conjunto de miRNAs específicos de las CTEs que promueven el ciclo celular denominados miRNAs ESCC, esenciales para el mantenimiento de la autorrenovación de las CTEs como la familia miR-302 (miR-302a/b/c). Por el contrario, la sobreexpresión de un conjunto característico de miRNAs (let-7e/b, miR-7, 15a, -29c -148a o miR-375) constituye un pequeño grupo que consideramos probables candidatos a coordinar las modificaciones en los programas de expresión génica que tienen lugar durante la diferenciación de las CTEs en la producción de células productoras de insulina.

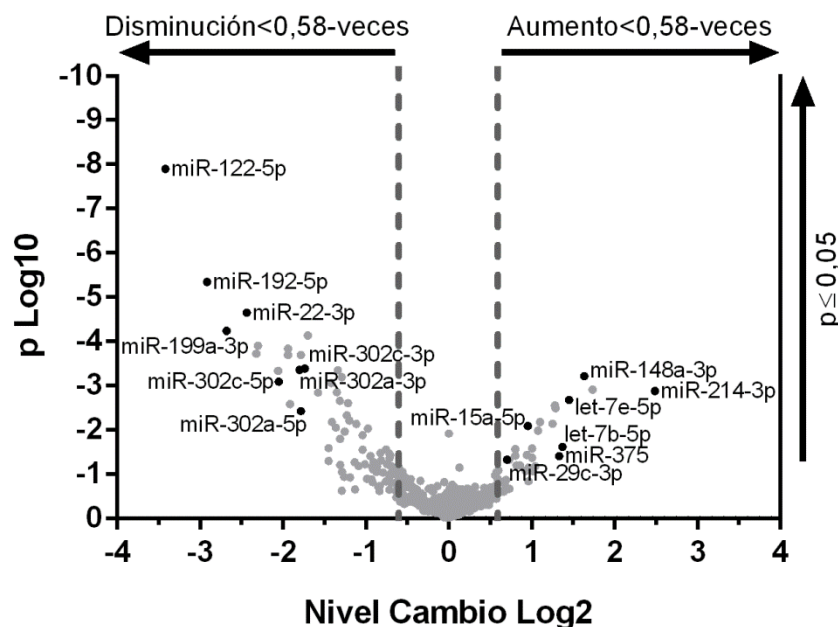


FIGURA 28. *Scatter plot* mostrando los miRNAs expresados diferencialmente entre las CTEs (HS181) diferenciadas de forma dirigida (CTE_ProtCABIMER) y diferenciadas espontáneamente (CTE_DifEsp) durante 22 días ($n=3$; $p \leq 0,05$). Los miRNAs representativos de la sobreexpresión o inhibición están resaltados.

Basándonos en este conjunto de observaciones, seleccionamos para su posterior análisis los miRNAs pertenecientes a este grupo dada su probable implicación en la obtención de células productoras de insulina a partir de las CTEs, así como un subgrupo adicional de miRNAs que mostraron una expresión preferente en los islotes pancreáticos respecto al conjunto del páncreas en las muestras analizadas.

4.3.3. Los miRNAs y la diferenciación de las CTEs

Los resultados significativamente estadísticos obtenidos del análisis de expresión de miRNAs mediante microarray comparando muestras de las CTEs no diferenciadas, diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE) o de forma dirigida mediante el protocolo CABIMER de diferenciación (DD-hCTE) deben ser validados. Resulta fundamental esta validación con el fin de asignar el patrón de expresión específico con certeza a causa de la variabilidad intrínseca de los datos del microarray de expresión. A partir de los resultados obtenidos evaluar los niveles de expresión de miles de miRNAs simultáneamente, sería muy poco práctico para verificar todos y cada uno ellos con cualquiera de los métodos descritos anteriormente. En lugar de ello, es habitual verificar un conjunto de miRNAs de interés en función de la finalidad y el alcance del experimento. Por tanto, basándonos en los resultados del microarray de expresión seleccionamos los agrupamientos o *clusters* de miRNAs de mayor relevancia en nuestro estudio. Basándonos en una respuesta biológica significativa se incluyeron en el análisis mediante qPCR aquellos con una marcada expresión diferencial de al menos 0,58 veces y un nivel de significación de 0,05 o inferior ($p \leq 0,05$).

Para definir el patrón de expresión de miRNAs en nuestro protocolo de diferenciación pancreática, el perfil de expresión en las CTEs durante la diferenciación fue cuantificado mediante qPCR (**Figura 29**) y el nivel de expresión se indicó utilizando las CTEs no diferenciadas como muestra de referencia normalizadas respecto al control endógeno snord48 (RNU48). Con el objetivo de confirmar la diferenciación secuencial de las CTEs

cultivadas al final del protocolo de diferenciación y profundizar en el estudio de potenciales miRNAs implicados durante todo el proceso de diferenciación pancreática, se analizó la expresión de los miRNAs identificados en el microarray en diferentes etapas clave del protocolo de diferenciación a días 0, 5, 14 y 22 para determinar la expresión de estos miRNAs en las CTEs que fueron inducidas a diferenciarse hacia células productoras de insulina durante 22 días.

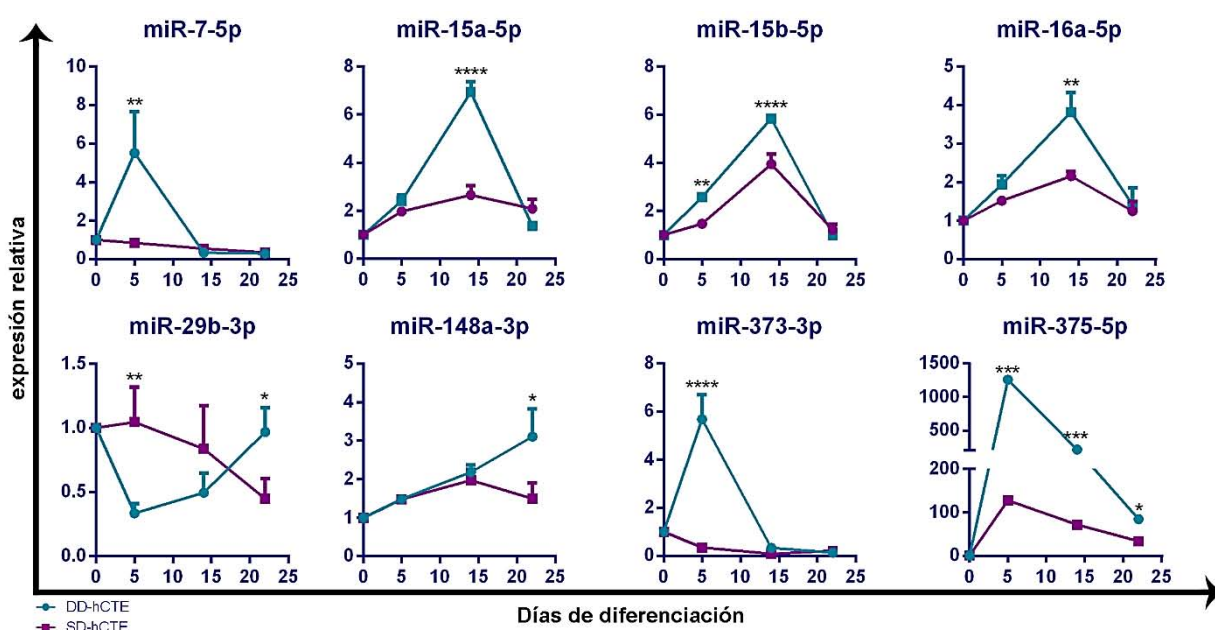


FIGURA 29. Análisis del curso temporal de la expresión de los miRNAs durante la inducción de la diferenciación pancreática en las CTEs (HS181). El nivel de expresión de los miRNAs fue cuantificado en células con diferenciación dirigida (DD-hCTE) y células diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE), mediante qPCR. Los valores son mostrados (media±SEM). n=3; *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ****p≤0,0001; acorde al test holm-šidák.

Los miRNAs con una expresión diferencial en alguna de las etapas de al menos 2 veces y un nivel de significación de 0,05 o inferior ($p \leq 0,05$) se muestran en la **Figura 29**. Los resultados de la qPCR indicaron que con el establecimiento del endodermo en las CTEs miR-7, -373 y -375 fueron progresivamente sobreexpresados y se encontró que su expresión se incrementaba significativamente en las primeras etapas del protocolo coincidente con el tratamiento con los factores que inducen la formación del endodermo definitivo, mientras que durante la proliferación endocrina hasta el día 14 su expresión disminuyó gradualmente. A continuación, las CTEs dieron lugar a los

progenitores pancreáticos y miRNAs de las familias miR-15 (miR-15a/b) y -16 (miR-16a) incrementaron su expresión durante la inducción del programa endocrino. En la última etapa de la diferenciación a día 22 miR-29b y -148a, presentaron un pico de expresión en las CTEs diferenciadas (DD-hCTE), durante la maduración de los progenitores endocrinos respecto a las CTEs diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE).

El mismo protocolo de diferenciación pancreática fue aplicado en la línea celular MSUH-001 de las iPSCs y se procedió a analizar el perfil de expresión de los miRNAs durante la diferenciación mediante qPCR siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente (Figura 30).

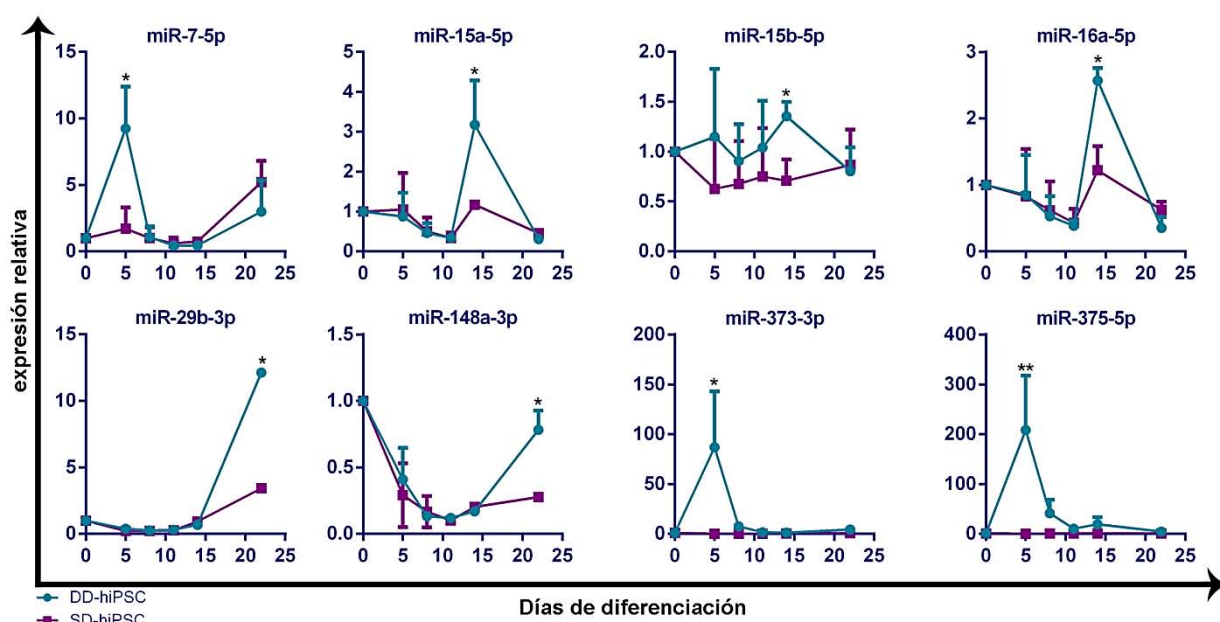


FIGURA 30. Análisis del curso temporal de la expresión de los miRNAs durante la inducción de la diferenciación pancreática en las iPSCs (MSUH-001). El nivel de expresión de los miRNAs fue cuantificado en células con una diferenciación dirigida (DD-hiPSC) y células diferenciadas espontáneamente (SD-hiPSC), mediante qPCR. Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01; acorde al test holm-šidák.

Esta línea celular con características muy similares a las de las CTEs en las que fue optimizado nuestro protocolo de diferenciación nos permitió comparar el perfil de expresión de los miRNAs en una línea celular diferente, para afianzar nuestras observaciones. El análisis reveló que el perfil de expresión de los miRNAs era muy similar en ambas líneas de células pluripotentes sometidas al protocolo de

diferenciación pancreática, de forma que miR-7, -373 y -375 presentaron aumento de expresión en las primeras etapas del protocolo de diferenciación a día 5, posteriormente en etapas más avanzadas se observa un incremento de expresión progresivo significativo a día 14 de miR-15a/b y -16, finalmente en las últimas etapas del protocolo de diferenciación vuelve a destacar la expresión de miR-29b y -148a, lo que proporcionó mayor consistencia a los resultados de expresión obtenidos previamente.

4.3.4. Los miRNAs y los islotes pancreáticos

Como ya se ha descrito existe una expresión de miRNAs específicos en distintos linajes celulares o en ciertas patologías y algunos de estos miRNAs han sido utilizados como marcadores celulares de la diferenciación o del estado funcional. En nuestro caso, identificamos varios miRNAs preferencialmente expresados en los islotes pancreáticos y generamos un perfil de expresión de los miRNAs pancreáticos, el cual reveló los miRNAs más abundantes indicando que posiblemente posean un papel importante en el desarrollo y la función del páncreas.

Con el fin de determinar los miRNAs diferencialmente expresados en las células de los islotes pancreáticos, se analizaron aquellos miRNAs preferentemente expresados en muestras de islotes pancreáticos, dando lugar a un *pool* de 50 miRNAs (**Figura 31**). El análisis del microarray de expresión reveló 23 miRNAs con un aumento de expresión en los islotes pancreáticos (let-7a/b/c/g, miR-7, -15b, -16, -26a, -27b -30d, -126, -130b, -216a, -148a, -195, -199a, -365a, -494, -375, -376a, -638, -1202 y -1207), mientras que 15 presentaron una expresión disminuida (let-7e, miR-22, -23a, -24, -27a, -29a/b/c, -125, -141, -34a, -200a/b/c y -1274a), sugiriendo que los diferentes tipos celulares que constituyen el tejido pancreático puede presentar un patrón específico de expresión de miRNAs.

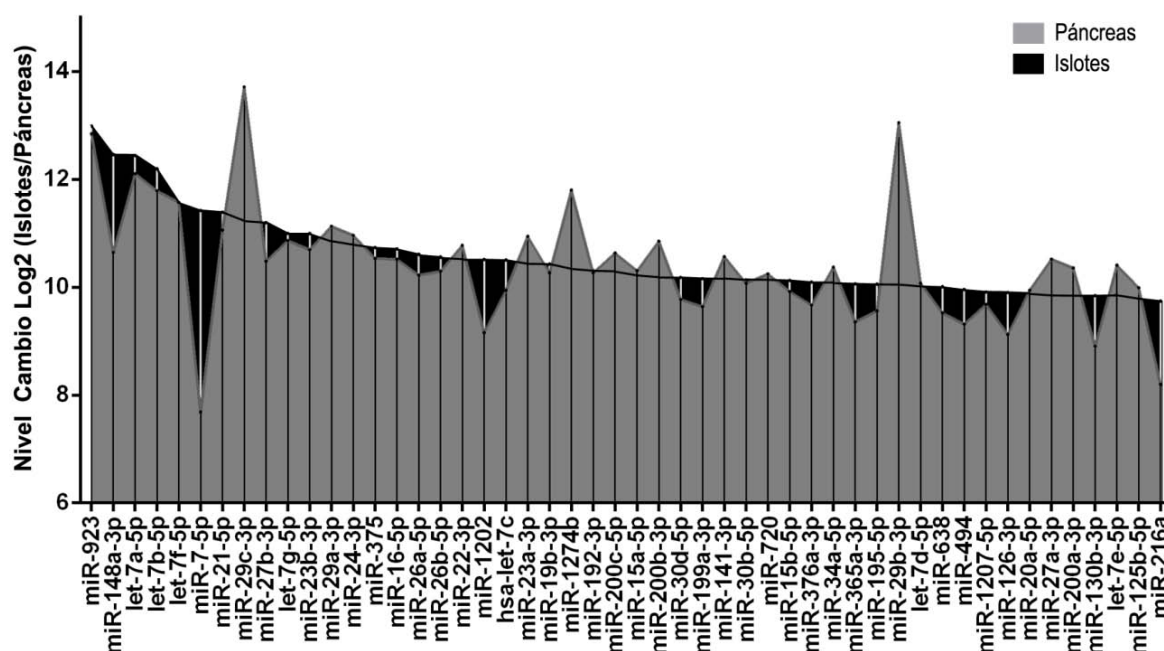


FIGURA 31. Análisis de los datos de expresión de los miRNAs en el páncreas obtenido mediante microarray, seleccionando los 50 miRNAs con mayor expresión en los islotes pancreáticos humanos adultos. Valores de expresión de los miRNAs normalizados expresados en forma logarítmica (Log2).

Para confirmar los datos de expresión del microarray obtenidos, analizamos la expresión de este subconjunto de miRNAs mediante qPCR (Figura 32).

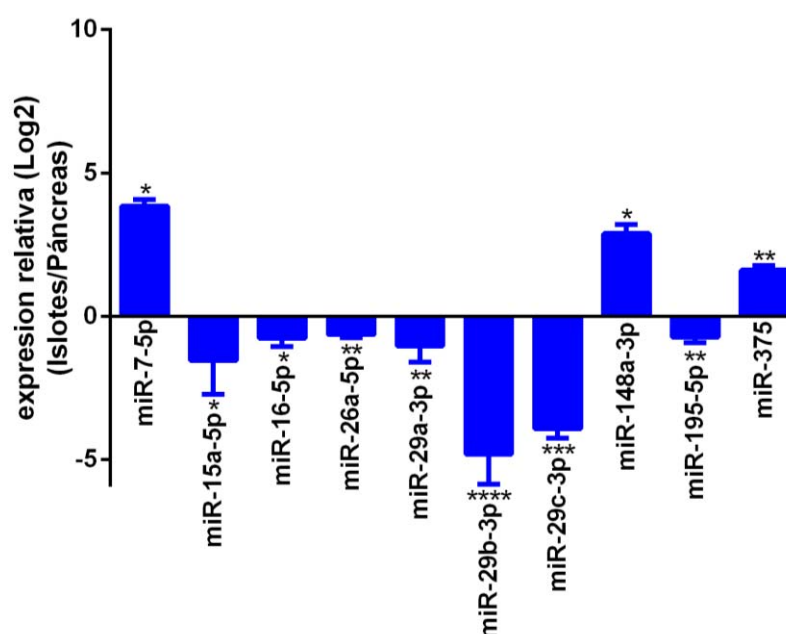


FIGURA 32. Validación de los datos de expresión del microarray de miRNAs mediante qPCR de las muestras de páncreas e islotes pancreáticos humanos adultos. Los valores de expresión relativa de los miRNAs detectados (calculadas a partir de los valores de Ct normalizados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$), fueron normalizados con el RNU48. Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001, ****p \leq 0,0001; acorde al test holm-šidák.

Los resultados revelaron los miRNAs con diferencias significativas de expresión (miR-7, -15a, -16, -26a, -29a/b/c, -148a, -195 y -375), confirmando los miRNAs diferencialmente expresados de los cuales 3 miRNAs fueron preferentemente expresados en los islotes pancreáticos respecto al conjunto del páncreas con un aumento del nivel de expresión (3-14,3 veces; $p \leq 0,05$) y 7 miRNAs presentaron una expresión disminuida (0,03-0,6 veces; $p \leq 0,05$), el resto de miRNAs analizados no presentó diferencias de expresión significativas.

Por tanto, determinamos que los miRNAs característicos de los islotes pancreáticos serán miR-7, -148a y -375. Para poder evaluar el posible papel regulador que están ejerciendo estos miRNAs debemos analizar los genes diana sobre los que pueden estar actuando. Cada miRNA identificado en el estudio constituye un potencial regulador de cientos de genes diana, lo que dificulta extremadamente los análisis individuales, además un gen puede ser potencialmente regulado por varios miRNAs. Por ello en primer lugar, realizamos un análisis bioinformático de las secuencias para establecer las posibles relaciones entre miR-7, -148a y -375, ya que los miRNAs agrupados dentro de un mismo *cluster* o agrupamiento podrían estar regulando el mismo conjunto de genes o al menos genes involucrados en los mismos procesos biológicos. En la **Figura 33** podemos apreciar como miR-7 constituye una familia de miRNAs localizada en el cromosoma humano 9q21.32, miR-375 está localizado en el cromosoma humano 2q35 entre los genes CRYBB2 y CCDC18 y miR-148a se localiza en el cromosoma humano 7p15.2 constituido por una familia de 3 miembros miR-148a, -148b y -152 con una secuencia semilla (*seed*) común.

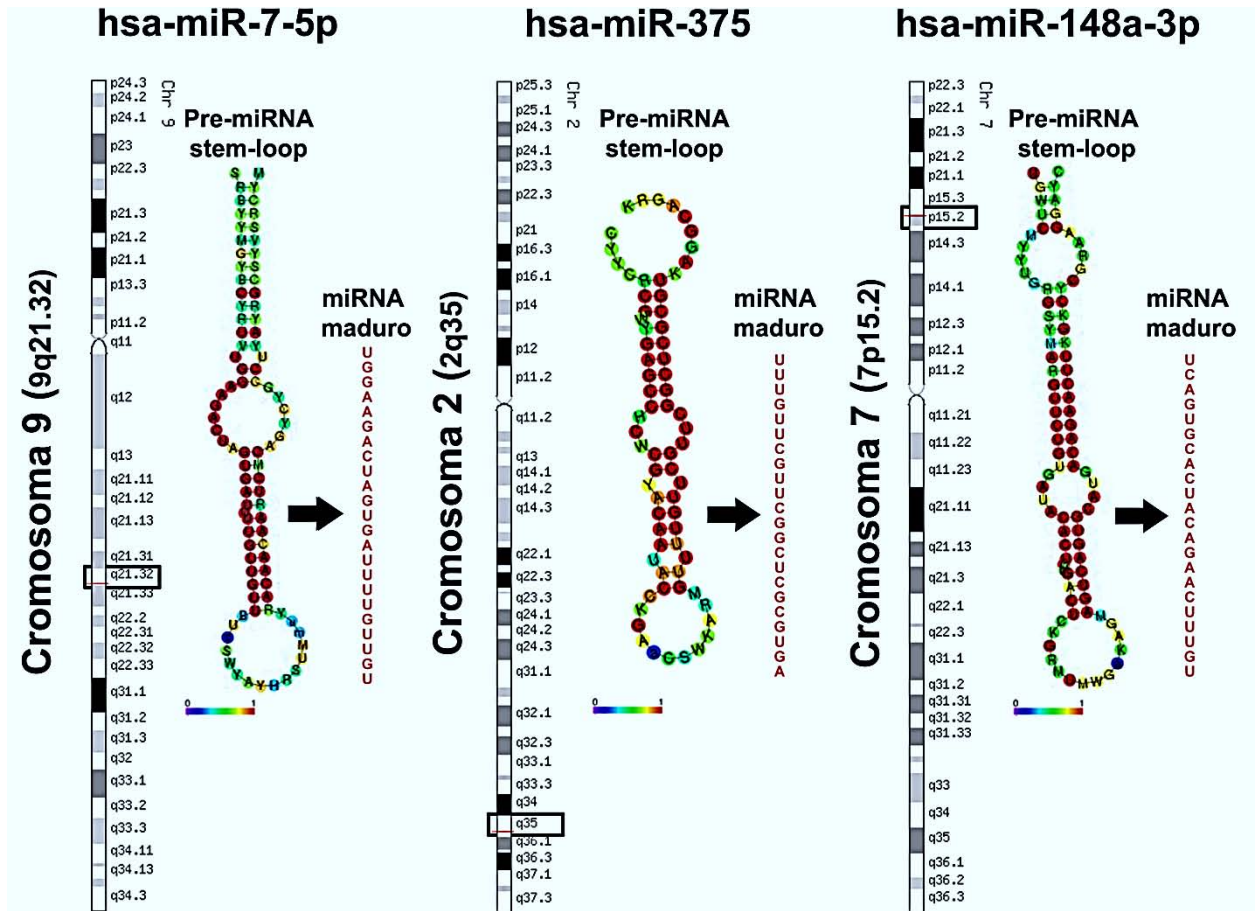


FIGURA 33. Localización cromosómica y predicción de la estructura secundaria del precursor del miRNA (pre-miRNA) de los miRNAs preferentes en los islotes pancreáticos. La escala de color determina el grado de conservación de las bases de la secuencia de dicha estructura precursora. Colores próximos al rojo muestran las bases más conservadas, mientras que colores próximos al azul indican bases menos conservadas.

Este análisis bioinformático previo nos reveló por un lado que los miRNAs son codificados en distinta localización cromosómica en el genoma, por lo que no pertenecen a un mismo *cluster* (agrupamiento) y podemos considerarlos miRNAs independientes. Por otro lado, la existencia de un elevado grado de conservación en la secuencia entre diferentes especies, especialmente en la región semilla (*seed*), sugiere que estas regiones no codificantes altamente conservadas deben desempeñar funciones básicas esenciales en el organismo y que la evolución ha conservado por esta razón su estructura al no permitir que se acumulen en ella mutaciones (**Figura 34**).

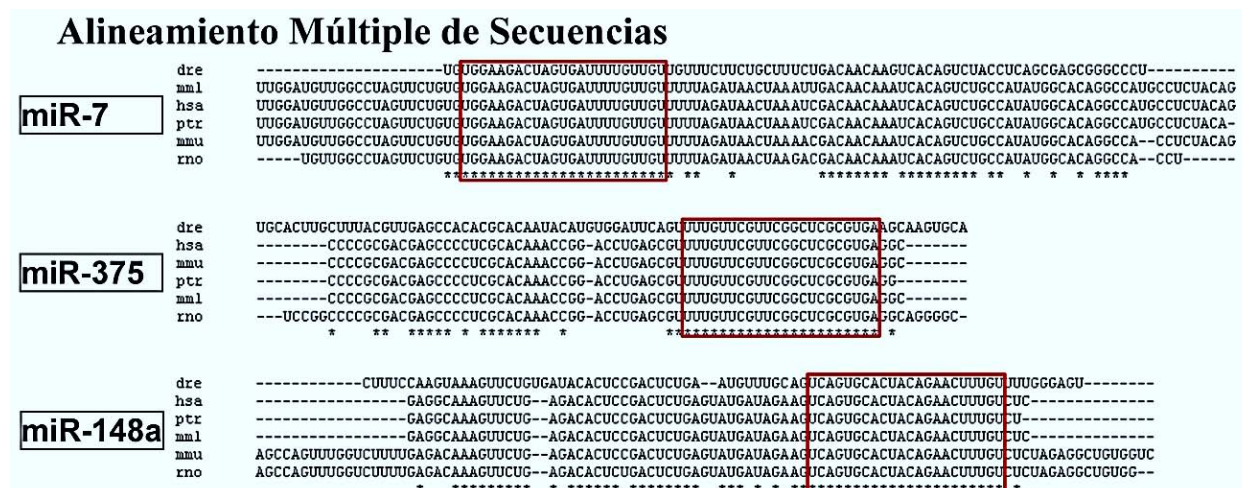


FIGURA 34. Alineamiento múltiple de secuencias de los miRNAs preferentes en los islotes pancreáticos usando el alineamiento global progresivo de secuencias de Needleman-Wunsch con la herramienta Clustal Omega del paquete EMBOSS, entre varias especies *Danio rerio* (dre), *Homo sapiens* (hsa), *Pan troglodytes* (ptr), *Mus musculus* (mmu) y *Rattus norvegicus* (rno).

Para elucidar la posible relación entre estos miRNAs (miR-7, -148a y -375) altamente expresados en los islotes pancreáticos, realizamos un segundo análisis de genes diana mediante la herramienta bioinformática miRSystem, una base de datos que integra una serie de conocidos programas de predicción de dianas génicas de los miRNAs (DIANA, miRanda, miRBridge, PicTar, PITA, rna22 y TargetScan) y contiene datos validados de otras bases de datos sobre la interacción entre los miRNAs y sus genes diana (TarBase y miRecords). Este análisis nos permite consultar múltiples miRNAs en un solo paso para establecer asociaciones entre los miRNAs y sus genes diana, para posteriormente caracterizar las funciones y rutas biológicas enriquecidas entre los genes diana de los miRNAs consultados empleando diferentes algoritmos. Dada la dificultad de estudiar todos los genes diana potenciales obtenidos, una vez que se proporcionaron la lista de los miRNAs a analizar con sus correspondientes ratios de expresión, seleccionamos los genes diana calculando la relación observado-esperado (O/E), considerando solo en este estudio dianas validadas experimentalmente con un ratio superior a 3,5 ($O/E > 3,5$), de forma que se obtiene la relación de aquellos genes diana con mayor probabilidad de ser regulados por los miRNAs a estudio reflejados en la **Figura 35**.

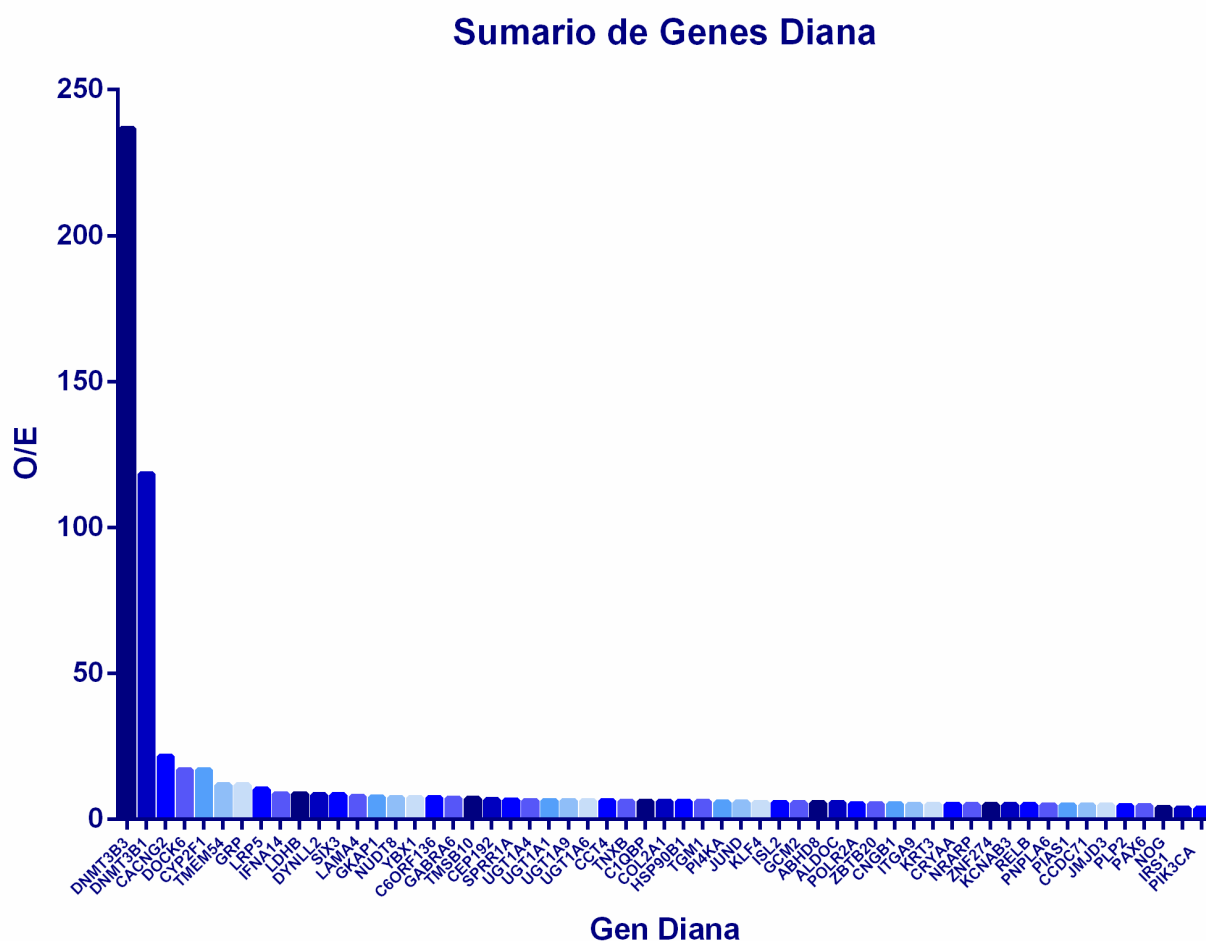


FIGURA 35. Identificación de genes diana de los miRNAs característicos de los islotes pancreáticos (miR-7, -148a y -375) en miRSystem mediante el ratio O/E. Se representan aquellos genes con mayor probabilidad de estar siendo regulados ($O/E > 3,5$).

El análisis se completó identificando las rutas biológicas enriquecidas relacionadas con la biología del páncreas en las que están involucrados los genes diana potenciales de los miRNAs analizados mediante el método *weighted pathway-ranking*, lo que requiere el conocimiento previo de los niveles de expresión de los miRNAs a comparar entre el grupo experimental y control que ya fueron determinados en el estudio previamente. Para este estudio fueron seleccionadas aquellas rutas con un *score* superior a 1 ($score > 1$), de forma que según las restricciones descritas tanto para la obtención de los genes diana potenciales como para las rutas biológicas asociadas, la lista obtenida se resume en la **Tabla 15**:

Categoría	Ruta	Genes Total/Diana	Unión miRNA	Score
KEGG	RUTA SEÑALIZACIÓN INSULINA	137/25	3	5,134
KEGG	CÁNCER PANCREÁTICO	70/19	2	5,542
REACTOME	CASCADA SEÑALIZACION RECEPTOR INSULINA	86/15	3	2,486
REACTOME	SEÑALIZACIÓN RECEPTOR INSULINA	109/15	3	1,977
KEGG	SECRECIÓN PANCREÁTICA	103/13	3	1,925
PATHWAY_INTERACTION_DB	RUTA INSULINA	44/7	3	1,857
REACTOME	SINTESIS Y PROCESAMIENTO INSULINA	135/3	3	1,799
REACTOME	REGULACIÓN SECRECION INSULINA	98/9	3	1,092

TABLA 15. Resultados tabulados de las rutas pancreáticas enriquecidas de miRNAs-genes diana basándose en la consistencia de múltiples algoritmos y el método *weighted pathway-ranking*.

A partir de los datos obtenidos, tal y como podemos observar en la **Figura 36**, los miRNAs miR-7, -148a y -375 podrían desempeñar una importante función en la regulación de la funcionalidad de las células beta pancreáticas.

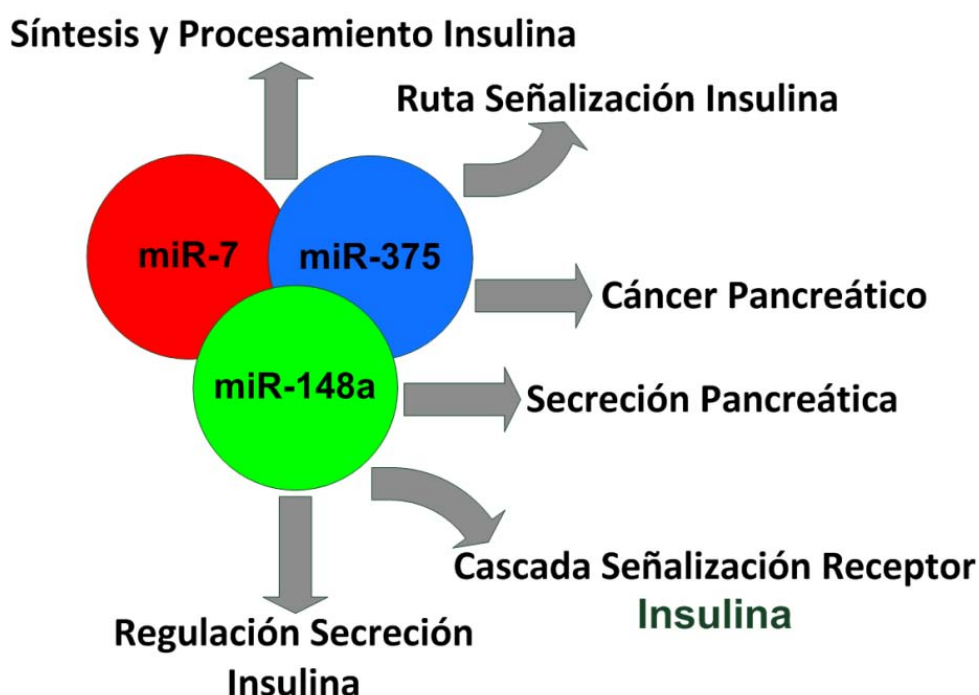


FIGURA 36. Principales rutas pancreáticas en las que están implicados los miRNAs con expresión preferente en islotes pancreáticos (miR-7, -148a y -375).

El componente endocrino del páncreas está constituido por los islotes pancreáticos formados a su vez por un mosaico celular productor de varias hormonas, entre las que podemos destacar las células beta pancreáticas encargadas fundamentalmente de la síntesis y secreción de insulina. La función básica de esta hormona es unirse con una proteína receptora en la membrana de las células, lo que permite una entrada de glucosa al interior de las mismas. Los miRNAs identificados (miR-7, -148a y -375) parecen tener implicación tanto en el proceso de síntesis de la insulina como en su mecanismo de acción tal y como revela el análisis bioinformático (**Figura 36**), el cual refleja elevados *scores* con diversas rutas relacionadas con funciones pancreáticas resumidas en la **Tabla 15**. El proceso más destacado en el que parecen intervenir estos miRNAs (miR-7, -148a y -375), con el mayor número de dianas identificadas (Co1, Crkl, AMPK, SOCS, IKK, IRS, PI3K, PDK1/2, PGC-1a, PEPCK, TSC1, PP1, PHK, mTOR, p70S6K, Ras, Raf, MEK1/2 y MNK) corresponde a la ruta de señalización de la insulina tal y como podemos observar en la **Figura 37**, por lo que pueden estar desempeñando un importante papel regulador en este proceso al estar involucrados en la regulación de varias cascadas de señalización de proteínas implicadas en el correcto funcionamiento de la ruta de señalización de la insulina. Los métodos bioinformáticos son una herramienta útil para predecir la unión de dianas, pero estas deben ser validadas. La identificación experimental y la verificación de las interacciones miRNA:mRNA diana puede llevarse a cabo de varias maneras. En nuestro estudio se detectaron cambios en las principales dianas identificadas a través de la cuantificación del nivel de expresión mediante qPCR tanto en las CTEs diferenciadas como en la línea celular INS-1E. Sin embargo, no detectamos ningún cambio en el nivel de expresión significativo, por lo que no pudimos confirmar ninguna de las dianas analizadas. No obstante, en la literatura es común que sólo un pequeño porcentaje de las interacciones miRNA:mRNA diana sea identificado y verificado experimentalmente, y muy pocas de estas verificaciones tienen lugar por más de un grupo de investigación o en múltiples tipos de células o tejidos. En su lugar, las predicciones de bases de datos son quizás más útiles para destacar

interacciones múltiples, que podrían servir como un punto de partida para la investigación de rutas de señalización en las que están implicados los miRNAs a estudio.

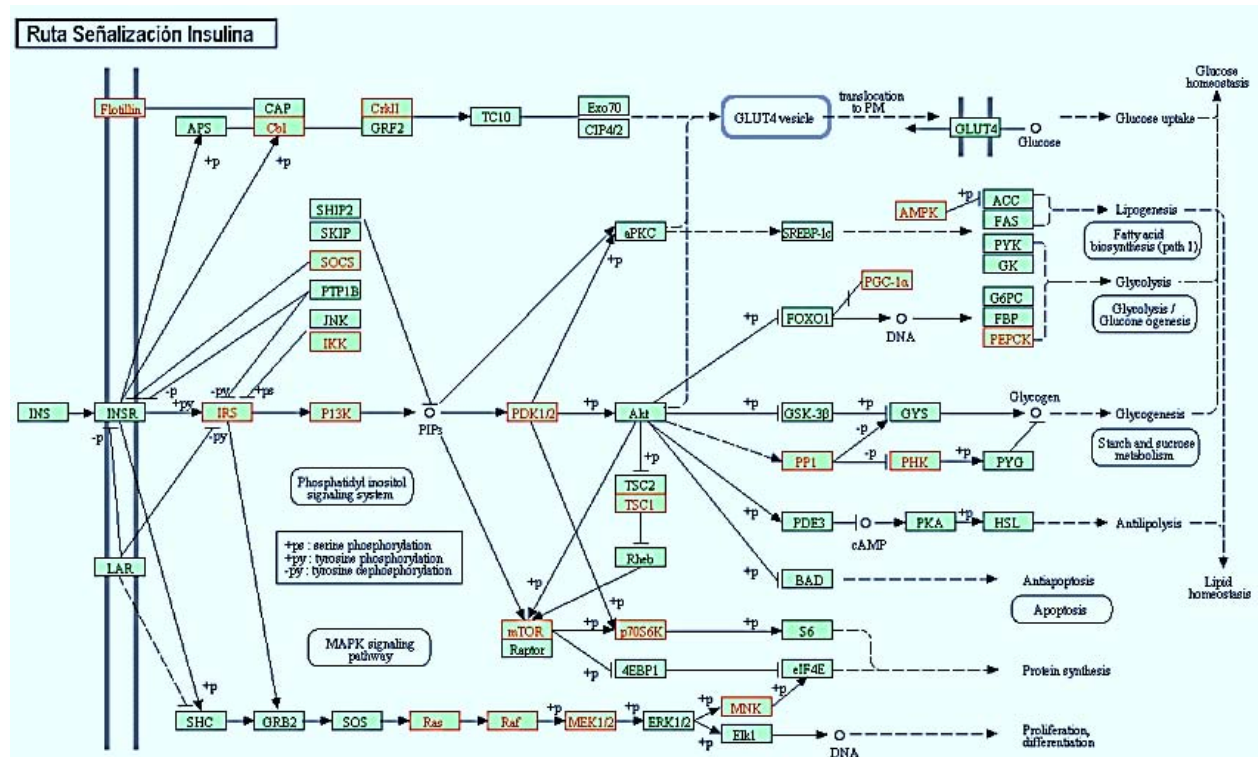


FIGURA 37. Descripción de la ruta identificada con mayor score en miRSystem (señalización de la insulina), procedente de la base de datos KEGG. Los genes resaltados en color rojo identifican a la predicción de genes regulados por los miRNAs consultados (miR-7, -148a y -375).

4.4. Los miRNAs y la obtención de células productoras de insulina a partir de CTEs

4.4.1. Selección de los miRNAs pancreáticos candidatos

Las CTEs como hemos visto pueden diferenciarse *in vitro* hacia células productoras de insulina, pero el control del proceso constituye actualmente un difícil reto. La diferenciación de las CTEs requiere una serie de complejos eventos que deben ser perfectamente coordinados para la transición de un estado de autorrenovación a un destino celular diferenciado determinado. Durante este proceso como hemos visto anteriormente existe una expresión asociada a un subconjunto específico de miRNAs, el

cual puede desempeñar un efecto crucial en la adquisición y mantenimiento de un fenotipo concreto.

Asumiendo la sobreexpresión de un miRNA como indicador de su función biológica, los miRNAs candidatos seleccionados a partir del subconjunto de interés identificado en el estudio para analizar su implicación en la diferenciación de las CTEs fueron miR-7, -148a y -375, ya que son altamente expresados tanto en el desarrollo pancreático humano coincidiendo con el incremento exponencial de expresión de las hormonas pancreáticas endocrinas como en los islotes pancreáticos adultos, lo que sugiere un papel potencial en la diferenciación celular endocrina y en el control del funcionamiento endocrino. Además, el análisis de expresión de miRNAs durante el proceso de diferenciación de las CTEs hacia células productoras de insulina puso en evidencia la expresión de estos miRNAs, confirmándose como miR-7 y -375 son preferentemente expresados en la población celular al establecerse el endodermo en las primeras etapas de diferenciación durante los primeros días (5d-11d) y van disminuyendo gradualmente en las posteriores etapas en los días intermedios (11d-22d), mientras que miR-148a presenta un patrón de expresión totalmente inverso aumentando su expresión gradualmente y siendo especialmente relevante en las últimas etapas en los días finales (11d-22d), como podemos observar en la detección mediante ISH en la **Figura 38**.

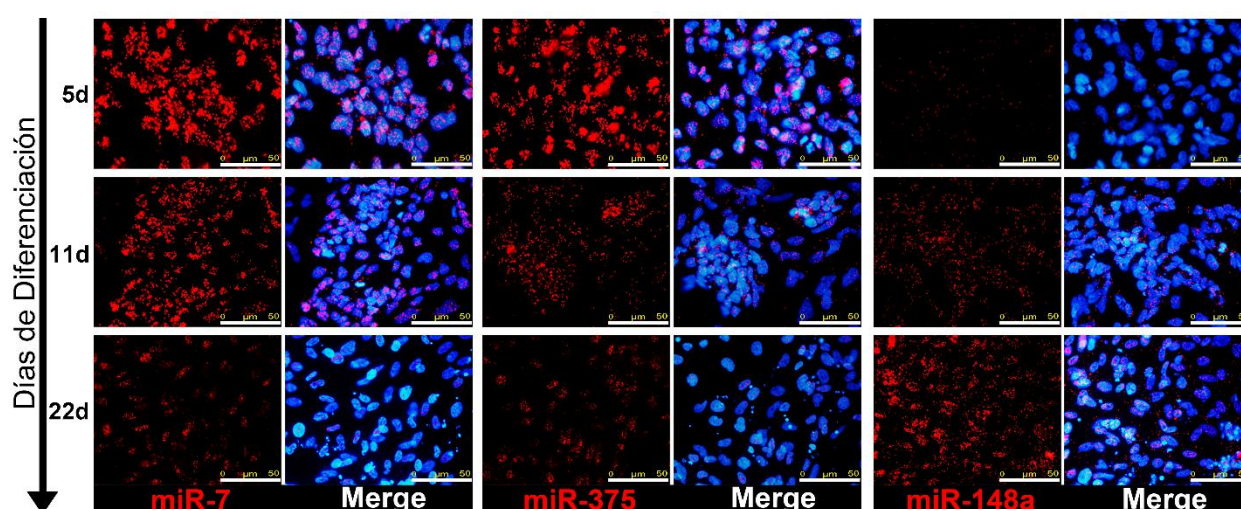


FIGURA 38. Detección mediante ISH de miR-7, -148a y -375 durante el protocolo CABIMER de diferenciación de las CTEs (HS181). Barra de escala =50 μ m.

Por tanto, nuestro protocolo de diferenciación evidenció una elevada expresión de miR-7 y -375 durante el establecimiento del endodermo definitivo, que constituye una de las primeras etapas esenciales para la diferenciación de las CTEs hacia un linaje pancreático y de miR-148a en las últimas etapas de diferenciación con el establecimiento y maduración de células productoras de insulina. Sin embargo, contrario a lo que podíamos esperar la expresión de miR-7 y -375 disminuye progresivamente en etapas posteriores del protocolo durante la diferenciación de los precursores pancreáticos endocrinos. Por ello, nos propusimos investigar los efectos de la sobreexpresión de estos miRNAs durante las últimas etapas del proceso de diferenciación dirigida de los progenitores endocrinos para formar células productoras de insulina y su posterior maduración respondiendo a los estímulos de glucosa. En consecuencia, examinamos la capacidad de los miRNAs seleccionados (miR-7 y -375) para potenciar la diferenciación de las CTEs en células productoras de insulina y mejorar el proceso de maduración mediante el uso de miR-mimic, que simulan los efectos de los miRNAs maduros endógenos según se esquematiza en la **Figura 39**.

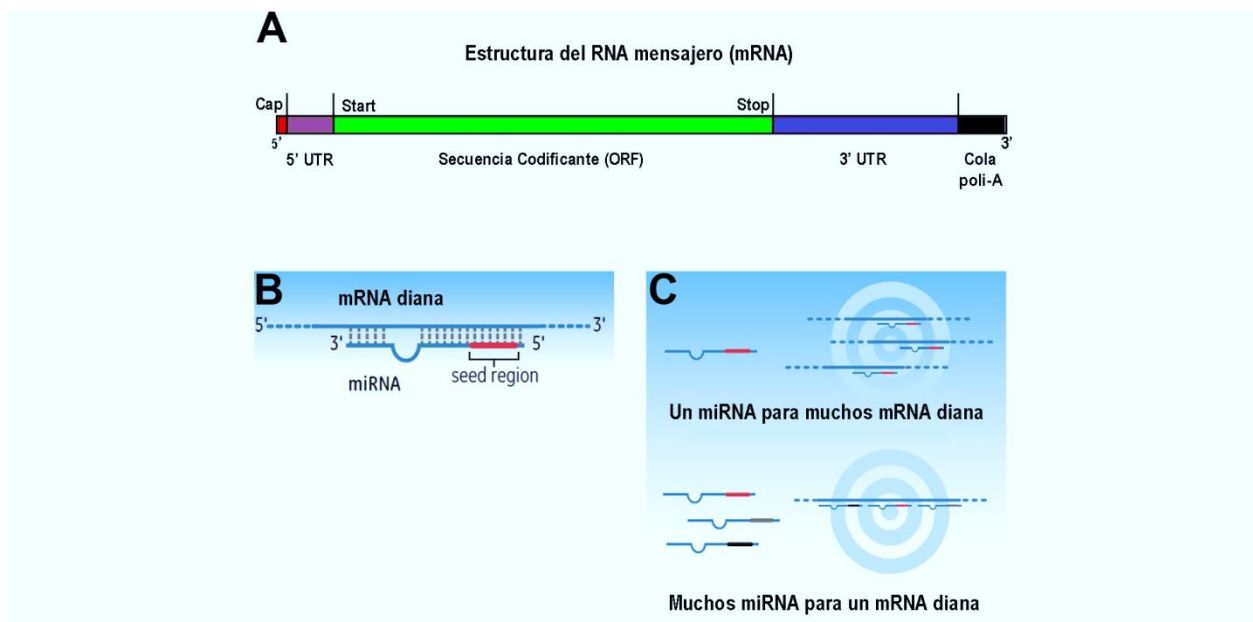


FIGURA 39. A) La molécula del mRNA presenta varias regiones que no son traducidas a proteínas incluidas la estructura caperuza o casquete (cap-5'), las regiones 5'-UTR y 3'-UTR y la cola poli-A. B) Los miR-mimic contienen un motivo de secuencia en su extremo 5' complementario con la secuencia del gen diana en la región 3'-UTR, denominada región semilla (*seed*). C) Posibilidades de regulación de los miRNAs mediante interacción de un único o múltiples miRNAs con mRNAs diana.

Los miR-mimic utilizados en nuestro estudio presentan un innovador diseño puesto que están formados por una triple cadena de RNA, en lugar de la doble cadena que caracteriza a los miR-mimic tradicionales como se representa en la **Figura 40**.

La cadena guía es una cadena de RNA no modificada con una secuencia que se corresponde exactamente con la anotación de secuencias en miRBase. Sin embargo, la cadena pasajera será dividida en dos cadenas de RNA modificadas, de forma que correctamente diseñadas la triple cadena resultante de RNA del miR-mimic es tan potente como la tradicional doble cadena, pero con la gran ventaja de que la naturaleza segmentada de la cadena pasajera asegura que sólo la cadena del miRNA guía será cargada en el RISC.

Por tanto, los cambios inducidos por el miR-mimic pueden ser asignados con total seguridad a la cadena del miRNA guía seleccionado para nuestro estudio.

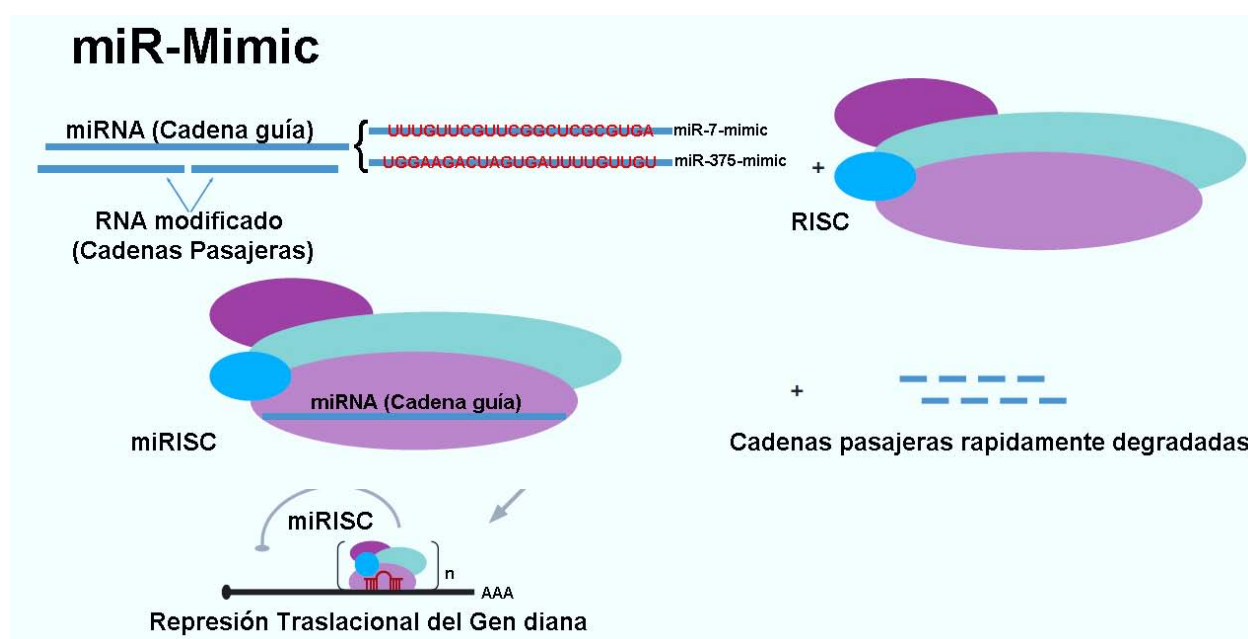


FIGURA 40. El diseño de triple cadena de RNA asegura completamente la mimetización del miRNA específico. Únicamente la cadena guía del miRNA es incorporada por el RISC dando lugar al miRISC que ejerce la represión del gen diana, mientras que las cadenas pasajeras son demasiado cortas para actuar como guías y son rápidamente degradadas después de la incorporación de la cadena guía.

4.4.2. Mecanismos de inducción y supresión de los miRNAs pancreáticos en las CTEs

La transferencia de los miRNAs sintéticos (miR-mimic) o inhibidores de miRNAs (anti-miRNA) representa una útil herramienta para el estudio de su función. En la actualidad existe una gran cantidad de herramientas para este fin como son la electroporación, microinyección directa, bombardeo de células y tejidos con microproyectiles, las transfecciones mediadas por virus, agregados químicos o polímeros catiónicos. La transfección mediada por virus y por polímeros catiónicos son los métodos más utilizados con células en cultivo. Los vectores virales constituyen un excelente vehículo para la transferencia de genes debido a su alta eficiencia, pero presentan algunas desventajas como la toxicidad de las partículas virales, requerimientos de producción y su elevado coste.

Por ello, para nuestro estudio se eligió la realización de transfecciones temporales o transientes mediante el uso de polímeros catiónicos que a diferencia de los virus se unen fácilmente a segmentos portadores de los miRNAs de interés y la evaluación inicial del proceso de transfección no reflejo una respuesta citotóxica.

Se llevó a cabo, un proceso de optimización de las condiciones para obtener una elevada eficiencia de transfección en las células en cultivo. Esta eficiencia de la transfección varía acorde al tipo celular y el agente de transfección utilizado, de modo que la optimización de la transfección constituye un paso crucial para maximizar la actividad programada del miR-mimic mientras que se minimizan los efectos secundarios. La adecuada combinación de tipo celular, agente de transfección y condiciones de transfección fue determinada empíricamente.

En nuestro estudio con las CTEs los parámetros esenciales evaluados para la optimización fueron los siguientes:

- Relación entre lípido y miR-mimic para una relación de cargas adecuada (0,5-5 μ L).

- Cantidad del miR-mimic empleado (20-200 nM).
- Incubación con la presencia o ausencia de suero y/o antibióticos.
- Tiempo de exposición de las células al complejo de transfección (8-24 horas)

Como resultado del proceso de optimización se establecieron las siguientes condiciones óptimas de transfección experimentales en nuestra línea celular (HS181):

miRNA 66,7 μ M	Exposición	Tubo 1: miRNA dilución (μ L/pocillo)		Tubo 2: DharmaFect dilución (μ L/pocillo)		Medio Incubación
[miRNA] (nM)	Tiempo (horas)	miRNA (μ L)	Medio Libre Suero (μ L)	DharmaFect (μ L)	Medio Libre Suero (μ L)	Medio Completo (μ L)
100	12	3	197	2,5	197,50	1600

TABLA 16. Resultado del proceso de optimización de los parámetros esenciales para la transfección del miR-mimic en las CTEs.

Con el objetivo de asegurar la efectividad de la transfección de los miR-mimic durante un tiempo suficiente para estudiar sus posibles efectos verificamos la expresión del miRNA correspondiente mediante qPCR del RNA total aislado de las CTEs transfectadas (DD-hCTE+miR-7) y un control de las CTEs sin transfectar (DD-hCTE).

Los resultados confirmaron un aumento del nivel de expresión significativo en las células transfectadas respecto a las células control. El cambio de expresión en células transfectadas (DD-hCTE+miR-7) después de 24 horas fue de aproximadamente 800 veces ($p \leq 0,001$) respecto al grupo control (DD-hCTE) y un incremento significativo se mantuvo durante 96 horas, cuando la expresión era aun aproximadamente 400 veces mayor ($p \leq 0,05$), a partir de entonces la expresión disminuye y no se observaron diferencias significativas (**Figura 41**).

Por tanto, la expresión de los miR-mimic fue estable durante al menos 4 días y pensamos que es suficiente para evaluar el posible efecto en el proceso de diferenciación de las CTEs.

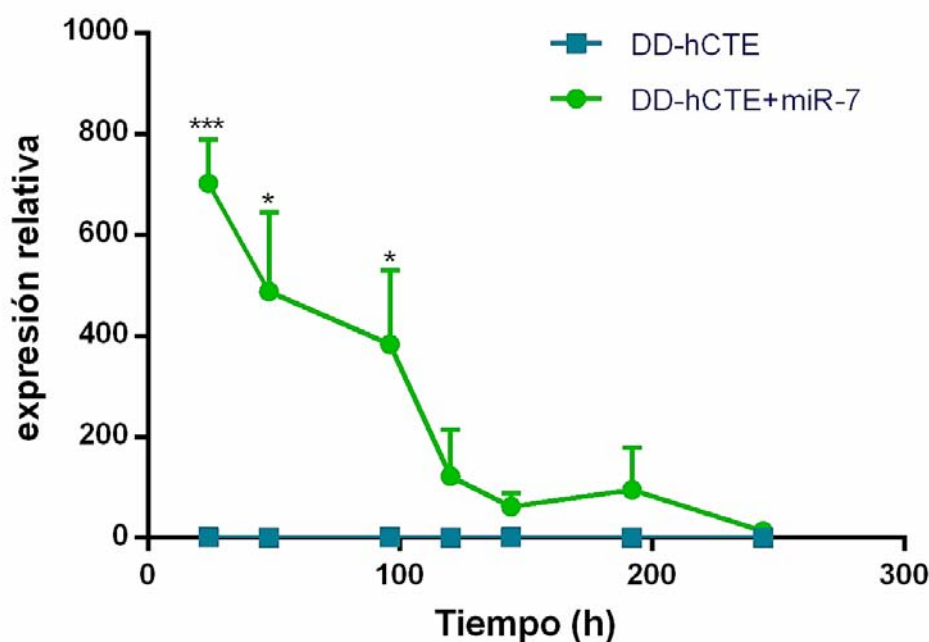


FIGURA 41. Análisis curso temporal de la expresión de miR-7 después de la transfección con su correspondiente miR-mimic. Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001; acorde al test holm-šídák.

Además, realizamos un estudio dosis-efecto para determinar la cantidad necesaria del miR-mimic para conseguir el mayor aumento de expresión significativo posible con la transfección. Lo que nos reveló que bajas concentraciones (20-50 nM) eran suficientes para producir un aumento de expresión significativo del miRNA de interés en las células. Sin embargo, la entrada del miR-mimic estaría limitada por un determinado nivel umbral de concentración que determinamos a partir de 100 nM (**Figura 42**), a partir del cual un aumento de la concentración no se traduciría en un aumento de expresión significativo, lo que reflejó un nivel de transfección límite en el que posiblemente el citoplasma celular no admite mayor entrada del miR-mimic, además de presentarse el riesgo de poder llegar a colapsar el RISC.

En conjunto, estos resultados nos revelaron que existiría un tiempo estable de sobreexpresión de al menos 96 horas con una concentración límite 100 nM.

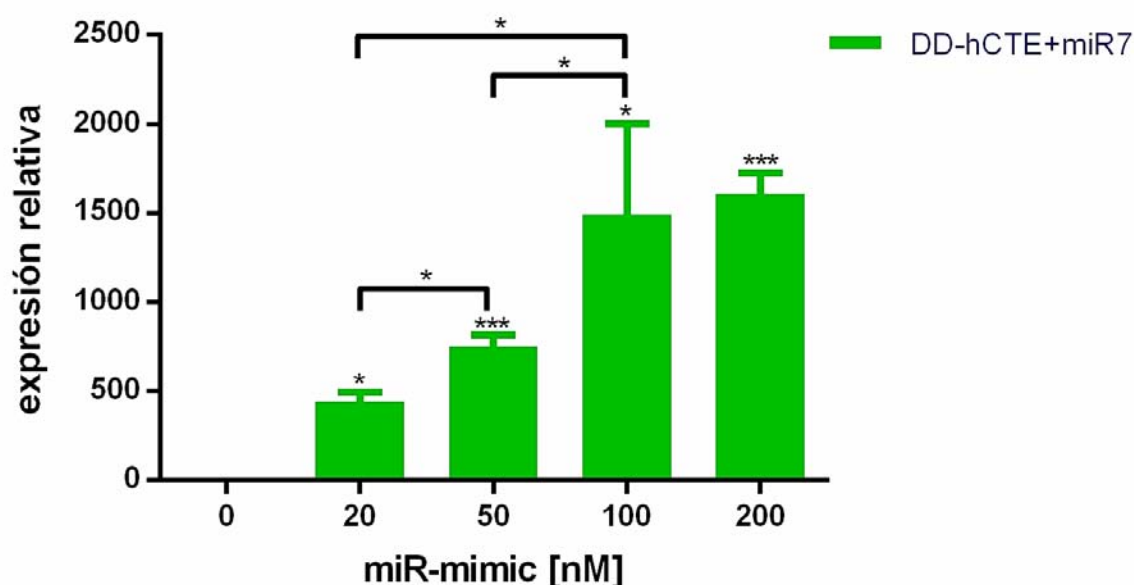


FIGURA 42. Análisis dosis-efecto de la expresión de miR-7 después de la transfección con su correspondiente miR-mimic en las CTEs, utilizando diferentes concentraciones (0, 20, 50, 100 y 200 nM) y la misma cantidad del agente de transfección (DharmaFECT, 2,5 μ L). Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; * $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$; acorde al test holm-šídák.

4.4.3. Efecto de la inducción de los miRNAs pancreáticos

Una vez establecidas las condiciones óptimas de transfección de los miR-mimic en las CTEs, procedimos a evaluar el efecto de la sobreexpresión de los miRNAs identificados previamente como candidatos (miR-7 y -375) para mejorar el proceso de diferenciación de las CTEs hacia células productoras de insulina. Como se ha descrito previamente nuestro protocolo de diferenciación reveló una alta expresión de miR-7 y -375 durante el establecimiento del endodermo definitivo en las CTEs en diferenciación, sin embargo su expresión disminuye progresivamente durante el resto de etapas de diferenciación, incluida la etapa final de maduración.

Por ello, investigamos los efectos de la sobreexpresión de estos miRNAs durante la maduración de los progenitores endocrinos para dar lugar a células productoras de insulina que respondan a estímulos de glucosa, examinando si serán capaces de potenciar la diferenciación pancreática en las CTEs en la etapa final de maduración a partir del día 14 (d14). Para ello, usamos los miR-mimic (mimic-miR-7, -375 y control)

para transfectar las CTEs de forma transitoria, incubando las células con los complejos de transfección durante 12-24 horas. Después de este periodo de transfección el medio de las células fue sustituido por medio de diferenciación pancreática y se mantuvieron en cultivo durante la etapa final de nuestro protocolo de diferenciación hasta el día 22 (d22), con el objetivo de mejorar la funcionalidad de las células obtenidas (**Figura 43**).

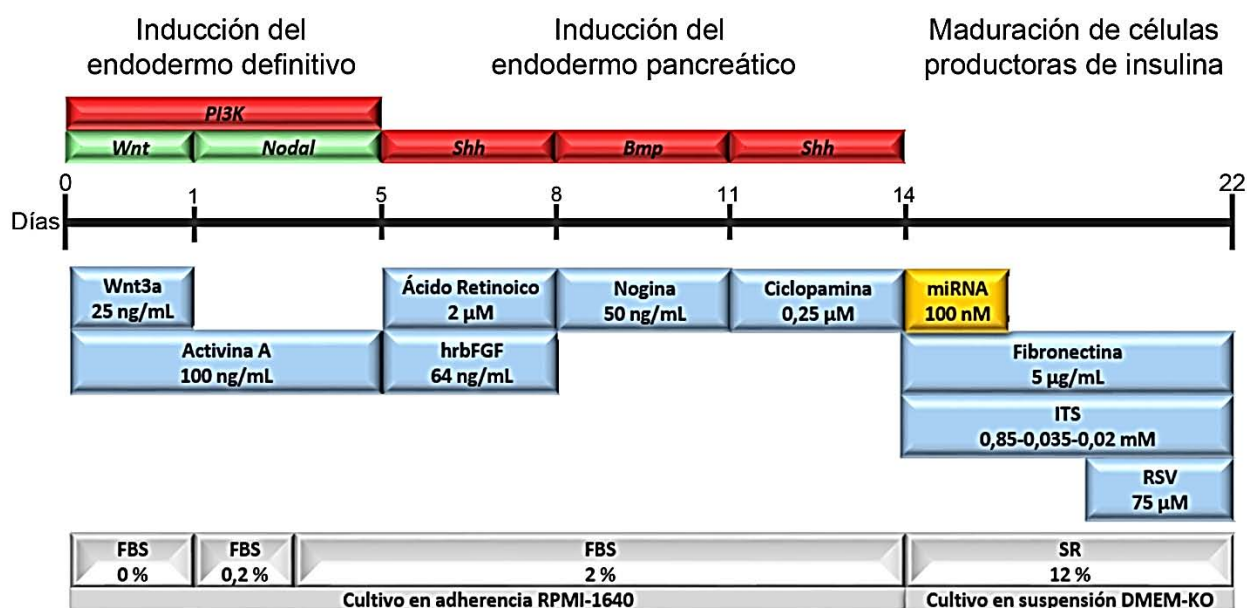


FIGURA 43. Visión esquemática del protocolo CABIMER de diferenciación en las CTEs (HS181). Las condiciones del medio de cultivo se indica en escala de grises, los factores de desarrollo en azul, las vías de señalización activadas en verde e inhibidas en rojo y la transfección de los miR-mimic (miR-7 y -375) en amarillo.

Con el objetivo de determinar la concentración que proporcionaba resultados óptimos donde la ventaja del incremento de dosis es contrarrestada por la aparición de efectos adversos en el fenotipo o la inexistencia de efecto, uno de los principales miR-mimic candidatos (miR-7) fue evaluado después de la transfección con el rango óptimo de concentración establecido previamente (20-100 nM). El último día del protocolo a día 22, se aisló el RNA total de las células para determinar cambios de expresión tanto en miR-7 como en un gen indicativo del desarrollo y la maduración de células productoras de insulina como es el de la insulina (*INS*) mediante qPCR (**Figura 44**), revelando los resultados que la mínima concentración asociada con una significativa sobreexpresión de miR-7 fue 20 nM (440 veces; $p \leq 0,05$) tal y como habíamos determinado previamente

durante el proceso de optimización de la transfección del miR-mimic. Sin embargo, observamos que se producía un aumento significativo de expresión en el gen de la insulina (*INS*, 8 veces; $p \leq 0,05$), relativo a una concentración óptima del miR-mimic 100 nM (1490 veces; $p \leq 0,05$). Por tanto, el análisis de la relación entre los niveles de expresión de miR-7 y de un gen pancreático esencial como es la insulina (*INS*), respecto a la cantidad del miR-mimic transfectado sugirió que el efecto en la diferenciación dependía de un nivel umbral de concentración del miR-mimic. En nuestro caso, los resultados sugirieron que un miR-mimic como miR-7 a una concentración de 100 nM es una herramienta útil para mejorar el proceso de diferenciación pancreático en las CTEs como se refleja en la **Figura 44**.

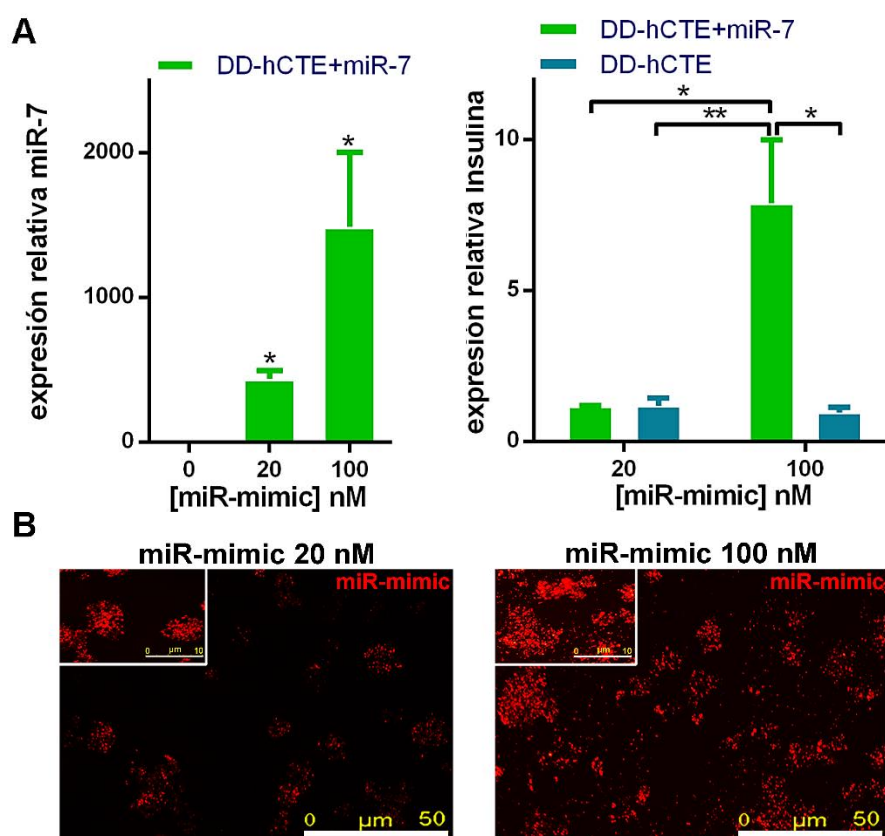


FIGURA 44. A) Efecto de la sobreexpresión del mimic-miR-7 a diferentes concentraciones (20 y 100 nM) en la expresión de *INS* durante la diferenciación de las CTEs (HS181) hacia células productoras de insulina mediante qPCR. Los valores son mostrados (media ± SEM). n=3; *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01; acorde al test Holm-Šidák. B) La transfección satisfactoria del miR-mimic (rojo) se observó mediante microscopía de fluorescencia, se muestran imágenes representativas a las 48 horas de la transfección con el control de transfección pierce Dy547-labeled miRIDIAN mimic a 20 y 100 nM. Barra de escala = 50 μm y 10 μm.

A continuación, ampliamos el análisis del patrón de expresión con un conjunto de genes pancreáticos después de la transfección de los miR-mimic (miR-7 y -375) en las CTEs durante la etapa de maduración del protocolo CABIMER de diferenciación. Para determinar la posible implicación de los miRNAs candidatos, miR-7 y -375, en el linaje endocrino diferenciado y confirmar si la sobreexpresión de estos podía inducir la diferenciación hacia células pancreáticas endocrinas, como sugerían nuestros resultados preliminares con miR-7. Las CTEs fueron transfectadas con un control-mimic negativo, los miR-mimic (miR-7 y -375, 100 nM) o solo el agente de transfección (vehículo) en la última etapa del protocolo de diferenciación a día 14 (d14), en la cual cultivamos las células en suspensión con el medio de diferenciación pancreática durante 8 días.

Para examinar el efecto de los miRNAs en esta última etapa de la diferenciación *in vitro* de las CTEs a partir del día 14 (d14), analizamos la expresión de hormonas producidas en los islotes pancreáticos y factores de transcripción esenciales en la población celular final. Como hemos visto previamente, los resultados obtenidos de la qPCR (**Figura 45**) revelaron que la expresión de un marcador clave de células beta pancreáticas como es el gen de la insulina (*INS*) presentaba un marcado incremento de expresión (8 veces; $p \leq 0,05$) en las CTEs transfectadas (DD-hCTE+miR-7) con elevadas concentraciones de miR-7 mimic (100 nM), de forma que el miRNA es claramente sobreexpresado (≈ 1000 veces; $p \leq 0,001$), sin embargo si la sobreexpresión es inferior (≈ 500 veces; $p \leq 0,001$), al utilizarse bajas concentraciones de miR-7 mimic (20 nM), no se observaron cambios de expresión significativos en el nivel de expresión de *INS* en el grupo transfectado (DD-CTE+miR-7) después de los 22 días (22d) de la diferenciación en las CTEs (**Figura 44**). Además de este marcador, se analizó la expresión de otros genes relevantes en el proceso de diferenciación pancreática. La transfección del miR-7-mimic (100 nM) produjo un aumento significativo de expresión en las CTEs diferenciadas (DD-hCTE+miR-7) respecto a las a las CTEs diferenciadas sin la incorporación del miR-7 mimic (DD-hCTE y DD-hCTE vehículo) en marcadores génicos muy importante en el desarrollo pancreático como son *PDX1* y *NEUROD1* (7,2 y 415,5 veces respectivamente; $p \leq 0,05$).

Esto demuestra como la transfección del miR-7-mimic incrementa significativamente la expresión de marcadores pancreáticos comparado tanto a las células sin transfectar con el miR-mimic (DD-CTE vehículo) como al grupo control de células no transfectadas (DD-CTE). Interesantemente, *FOXA2* un regulador de *PDX1*, el cual es sobreexpresado en la diferenciación hacia el endodermo definitivo, fue reexpresado aumentando su expresión significativamente (6,2 veces; $p \leq 0,05$) por la introducción del miR-7-mimic en las células durante la última etapa del protocolo de diferenciación. Se evaluó también mediante las mismas condiciones el posible efecto de la transfección de miR-375 mimic (100 nM). Sin embargo, los resultados de expresión obtenidos revelaron que parece no ejercer un efecto evidente en la etapa final de la diferenciación pancreática, al no observarse diferencias significativas después de la transfección de este miRNA en ninguno de los genes estudiados (*FOXA2*, *PDX1*, *NEUROD1* e *INS*) como se observa en la **Figura 45**.

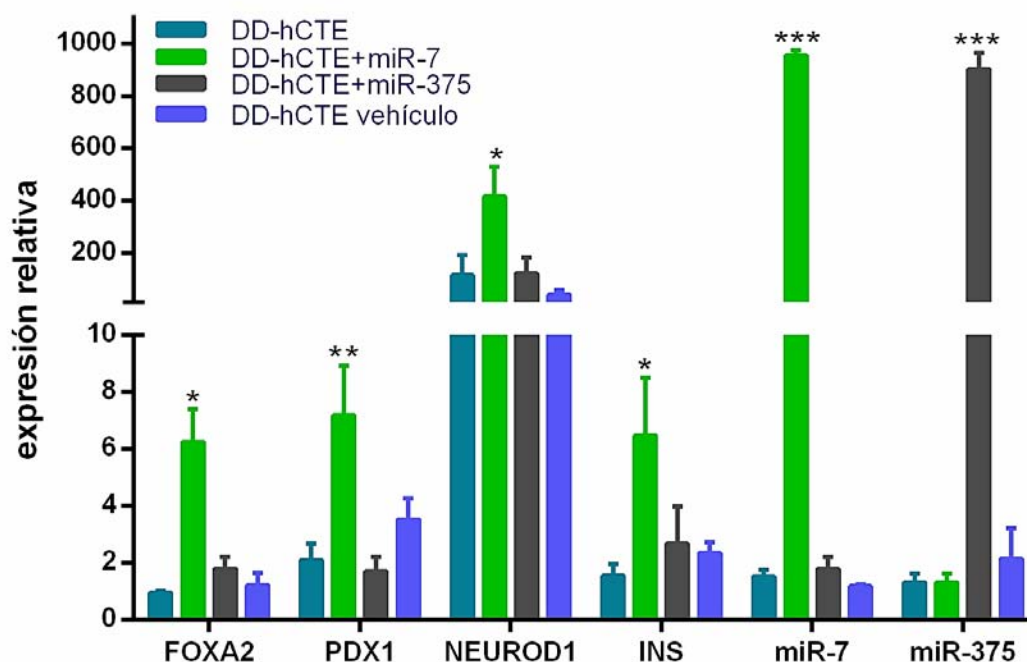


FIGURA 45. Efecto en la diferenciación pancreática después de la transfección de los miRNAs candidatos (miR-7 y -375). Análisis de la expresión génica de células diferenciadas al final de la etapa de maduración tratadas con miR-7-mimic y miR-375-mimic (100 nM), mediante qPCR (*INS*, *PDX1*, *NEUROD1* y *FOXA2*). Los valores son mostrados (media \pm SEM). $n=3$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; acorde al test Holm-Šidák.

En función de los resultados obtenidos con la sobreexpresión de los miRNAs candidatos (miR-7 y -375), nos centramos en el estudio de miR-7. Para determinar la capacidad de liberación hormonal de las células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs sometidas a una sobreexpresión o inhibición de miR-7 al finalizar el protocolo de diferenciación, examinamos muestras del medio de cultivo para detectar los niveles de insulina. Con el fin de comprobar un potencial mejorado de secreción hormonal acoplado a estimulación, las células diferenciadas a día 22 (d22) fueron sometidas a un ensayo de secreción secuencial de insulina incluyendo baja y alta concentración de glucosa (2 y 20 mM, respectivamente) y una estimulación final añadiendo KCl (30 mM) (**Figura 46**). El KCl induce la despolarización de la membrana celular (potencial más positivo) parcialmente mediante una reducción de su permeabilidad al potasio (K^+) que dará lugar a la apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes aumentando la concentración de calcio (Ca^{2+}) citoplasmático con la consecuente liberación de insulina. Un aumento significativo en la concentración de insulina fue observada cuando se añadió glucosa al medio celular (Solución de Krebs) a una concentración alta 20 mM ($1,6 \text{ mU/L}/10^5$; $p \leq 0,05$), en comparación con un medio que contenía baja concentración de glucosa 2 mM ($0,5 \text{ mU/L}/10^5$) en las células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs transfectadas con el miR-7-mimic (DD-hCTE+miR-7), respecto al grupo control de células sin transfectar con miR-7 mimic (DD-hCTE vehículo) en las cuales se observó un incremento de la secreción de insulina pero con diferencias no significativas en los niveles de insulina entre condiciones de baja (2mM) y alta (20 mM) concentración de glucosa ($1,9 \text{ mU/L}/10^5$ y $0,9 \text{ mU/L}/10^5$ respectivamente).

En general, las células diferenciadas, ya sean transfectadas (DD-hCTE+miR-7) o no con el miR-7-mimic (DD-hCTE vehículo), respondieron a la despolarización con KCl ($2,8 \text{ mU/L}/10^5$ y $2,3 \text{ mU/L}/10^5$, respectivamente). Sin embargo, las células en las que se inhibió la expresión de miR-7 (DD-CTE+amiR-7) se observó una inhibición en la secreción de insulina ante cualquier estímulo, existiendo únicamente una expresión basal de esta ($1,1 \text{ mU/L}/10^5$, $1,03 \text{ mU/L}/10^5$ y $0,5 \text{ mU/L}/10^5$). Por otro lado, las células diferenciadas

espontáneamente (SD-hCTE) empleadas como control del protocolo de diferenciación, secretaron niveles de insulina mínimos ($0,4 \text{ mU/L}/10^5$) en respuesta a cualquiera de los estímulos realizados (**Figura 46**).

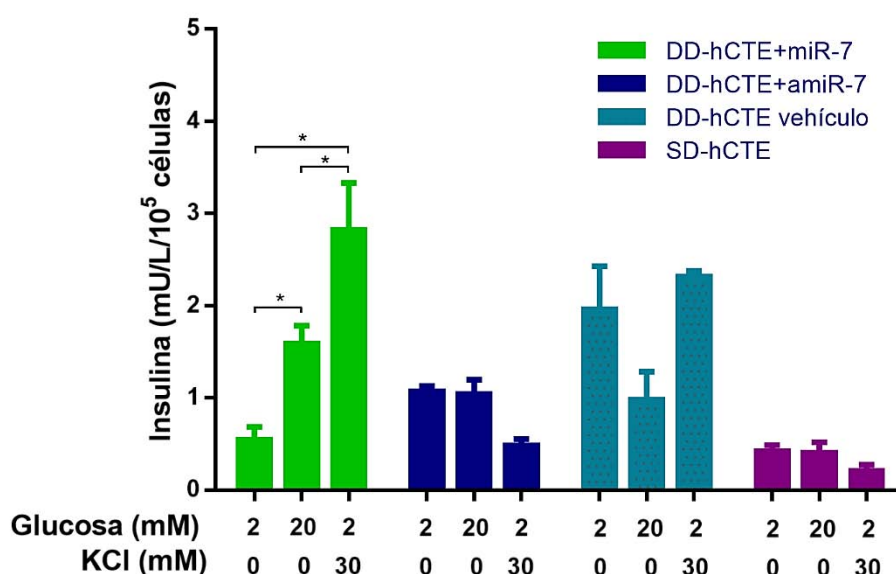


FIGURA 46. Análisis de liberación de insulina en respuesta a estímulos de glucosa determinada mediante ELISA y normalizada al número total de células. Las células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs fueron incubadas en solución KREBS con diferente concentración de glucosa (2 y 20 mM) de forma secuencial y KCl (30 mM). Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; *p \leq 0,05; acorde al test Holm-Šidák.

A continuación, evaluamos la expresión de INSULINA y PÉPTIDO C mediante IF en las células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs con sobreexpresión (DD-hCTE+miR-7) o inhibición de miR-7 (DD-hCTE+amiR-7), solo el agente de transfección (DD-hCTE vehículo) y células diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE) como se observa en la **Figura 47**. La colocación de INSULINA y PÉPTIDO C fue observada solo en el grupo de células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs (DD-hCTE+miR-7, DD-hCTE+amiR-7 y DD-hCTE vehículo), mientras que las células diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE) no mostraron expresión. Además, el análisis cuantitativo de la señal de fluorescencia mediante MetaMorph confirmó que la inhibición de miR-7 (DD-CTE+amiR-7) resultaba en una disminución significativa del número de células positivas para INSULINA y PÉPTIDO C.

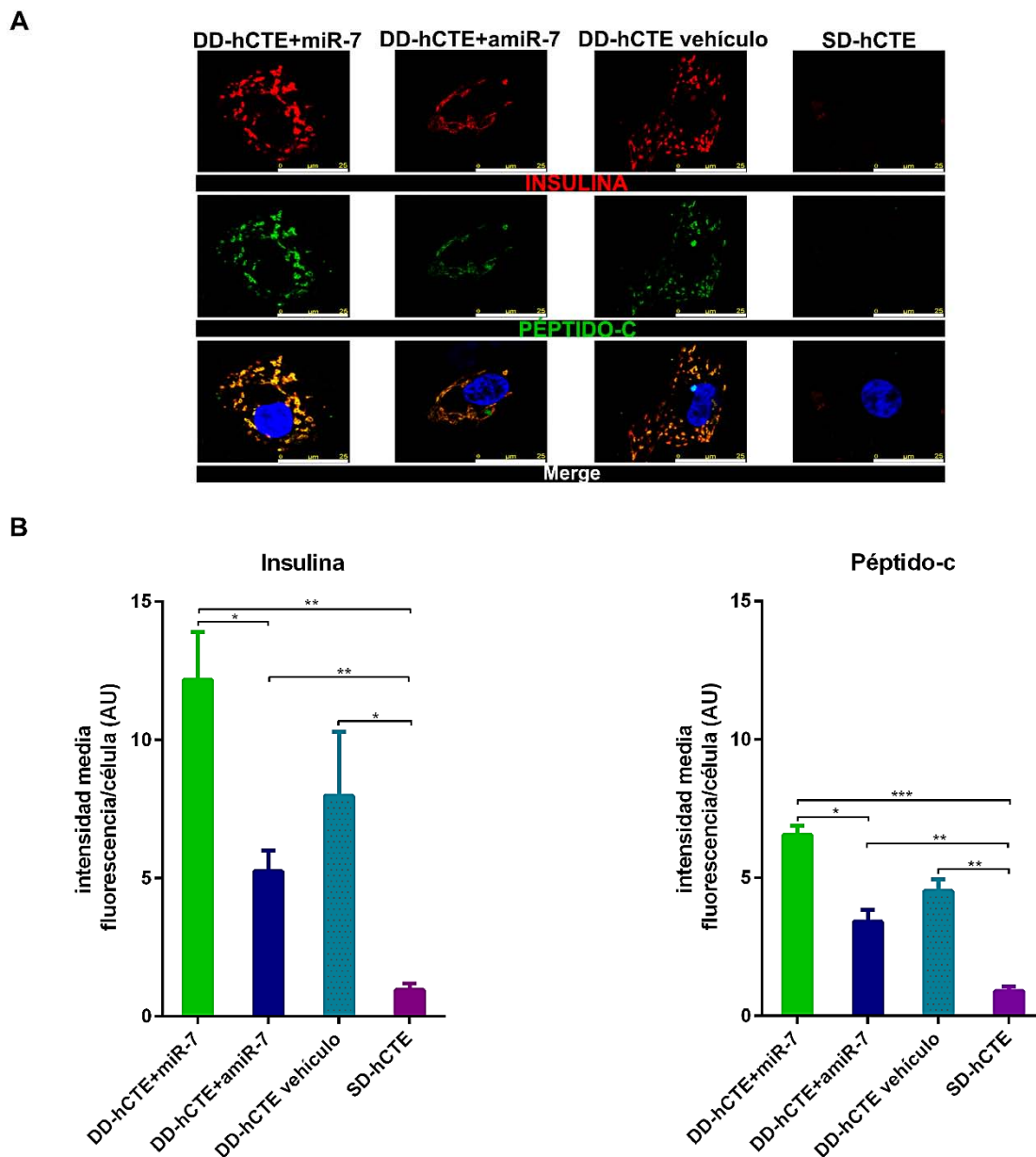


FIGURA 47. Efecto de miR-7 en la diferenciación de las CTEs. A) Imagen de IF confocal representativa de células que expresan INSULINA (rojo) y PÉPTIDO C (verde) y codetección de núcleos con Hoechst 33342 (azul). En las CTEs humanas diferenciadas espontáneamente (SD-CTE) y las células con diferenciación dirigida con transfección de miR-7 (DD-CTE+miR-7), inhibidor de miR-7 (DD-CTE+amiR-7) o solo agente de transfección (DD-CTE vehículo). Barra de escala =25 μ m. B) Los gráficos de barras muestran la cuantificación mediante análisis con MetaMorph de la intensidad media de INSULINA y PÉPTIDO-C en las células positivas. Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001; acorde al test Holm-Šídák.

Estos resultados se correspondieron con la observación previa de que las células diferenciadas con inhibición de miR-7 secretan una cantidad de insulina más baja, además de no responder a los estímulos de glucosa como se ha descrito anteriormente.

Finalmente, analizamos si miR-7 podía ser detectado durante los días 5 (d5), 11 (d11) y 22 (d22) del protocolo de diferenciación mediante ISH. A nivel morfológico la ISH reveló que miR-7 era expresado significativamente en las etapas tempranas del protocolo a día 5 (d5; $p \leq 0,001$) en las células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs (DD-hCTE) comparado con las células diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE) y observamos como su expresión disminuía gradualmente del día 5 al 22 (d5-d22) durante el proceso de diferenciación. Además, la expresión de miR-7 fue evaluada también mediante ISH en las células transfectadas con el miR-mimic correspondiente (DD-hCTE+miR-7), confirmando la sobreexpresión al final del protocolo de diferenciación a día 22 (d22; $p \leq 0,05$) (**Figura 48**), confirmando los resultados obtenidos previamente mediante qPCR.

Con el objetivo de identificar la naturaleza de las células que expresan miR-7 realizamos una codetección de las secciones hibridadas con miR-7 y anticuerpos específicos para marcadores esenciales que están implicados en la formación del páncreas y la diferenciación de células beta pancreáticas (SOX17, PDX1 y NKX6.1), seleccionando etapas claves en el protocolo de diferenciación pancreático a los días 5 (d5), 11 (d11) y 22 (d22) (**Figura 48A-C**). Los niveles de IF fueron cuantificados usando el software MetaMorph en las CTEs diferenciadas espontáneamente (SD-hCTE) o con diferenciación dirigida (DD-hCTE o DD-hCTE+miR-7), junto con la codetección de miR-7 y usando como marcador nuclear Hoechst 33342. Durante el establecimiento del endodermo definitivo la detección de SOX17 y miR-7 reveló la colocalización y un incremento generalizado significativo a día 5 (d5) de SOX17 (0,5 veces; $p \leq 0,001$) en las células diferenciadas (DD-hCTE). El experimento fue repetido posteriormente a día 11 (d11) con PDX1, el cual tiene un importante papel en la inducción de las células productoras de insulina y los experimentos de codetección con miR-7 mostraron que en las células diferenciadas (DD-hCTE), las colonias celulares positivas para este miRNA lo fueron también para PDX1, mientras que las negativas para PDX1 lo fueron para miR-7, además de un incremento de expresión significativo de PDX1 (0,1 veces; $p \leq 0,5$).

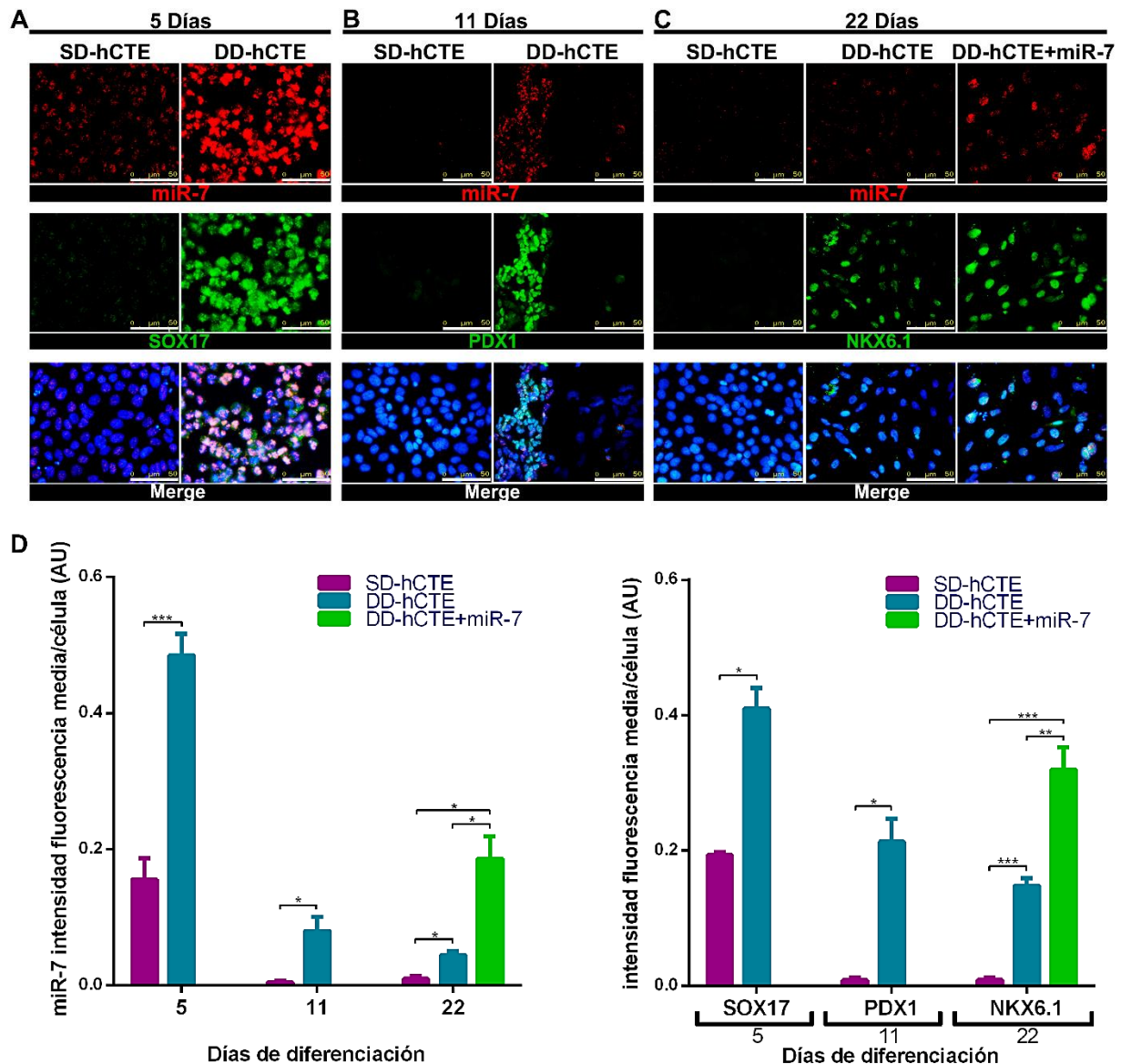


FIGURA 48. Efecto de miR-7 en la diferenciación de las CTEs. A-C) Diferenciación hacia el endodermo definitivo de las CTEs a día 5 (d5): detección de SOX17 por IF (verde) y de miR-7 por ISH (rojo); A día 11 (d11) la diferenciación dirigida de las CTEs muestra colocalización de PDX1 y miR-7; A día 22 (d22) NKX6.1 (verde) y miR-7 (rojo) fueron expresados en células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs. Codetección de núcleos con Hoechst (azul). Barra de escala =50 μ m. (D) La gráfica muestra la cuantificación mediante análisis de MetaMorph de la intensidad media en las células positivas de SOX17, PDX1 y NKX6.1, y la expresión de miR-7. Los valores son mostrados (media \pm SEM). n=3; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001; acorde al test Holm-Šidák.

En la última etapa del protocolo de diferenciación las células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs (DD-hCTE) presentaban poblaciones positivas para NKX6.1 y miR-7 colocalizadas, observándose que la sobreexpresión de miR-7 a día 22 (d22) en las células transfectadas (DD-hCTE+miR-7) favoreció significativamente la expresión de

NKX6.1 (0,2 veces; $p \leq 0,05$), un importante factor en el desarrollo del páncreas y su maduración (**Figura 48D**). Estos resultados nos muestran la capacidad de algunos miRNAs como miR-7 para alterar la expresión de genes implicados en la especificación pancreática de las CTEs.

5. DISCUSIÓN

Las células troncales pluripotentes son motivo de intensa investigación debido a la posibilidad de su utilización para la prevención o el tratamiento de lesiones y enfermedades degenerativas. Las CTEs son células pluripotentes con capacidad para diferenciarse *in vivo* e *in vitro* a cualquiera de los tipos celulares propios del embrión. Estas células representan una fuente potencialmente ilimitada de células diferenciadas o tejidos que se pueden utilizar para la terapia de reemplazo en el tratamiento de afecciones comunes como la diabetes. A pesar de los sustanciales desafíos que conlleva trasladar una terapia celular para la diabetes, la trayectoria clínica de una terapia celular de islotes pancreáticos ha sido probada (Barton et al., 2012; Warnock et al., 2008). A diferencia de la mayoría de otras terapias potenciales de células troncales, una terapia celular para la diabetes no requiere integración funcional de las células trasplantadas en el tejido afectado ya que el trasplante en localización ectópica puede proporcionar el reemplazo de insulina adecuado para controlar la glucemia (Merani et al., 2008). Por lo tanto, es razonable prever un tratamiento exitoso de la diabetes con células productoras de insulina obtenidas a partir de células troncales pluripotentes, siempre que se puedan desarrollar métodos para producir células funcionales, seguros y eficaces para el trasplante al tiempo que protege las células de la autoinmunidad y el rechazo allogénico (Soria et al., 2016).

La pluripotencia de las CTEs viene definida por una ilimitada autorrenovación y la capacidad para diferenciarse hacia cualquiera de las capas primarias germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). La diferenciación de estas células requiere un coordinado control de la expresión de marcadores de pluripotencia incluyendo a *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* y el aumento de genes específicos de linaje (Noggle et al., 2005; Trounson, 2006; Ohtsuka y Dalton, 2008; Wong et al., 2011). Para averiguar los mecanismos de diferenciación de las CTEs hacia diferentes linajes, se han desarrollado diversas técnicas de diferenciación *in vitro* para generar células productoras de insulina, consistentes en protocolos que simulan el desarrollo embrionario normal (León-Quinto et al., 2004; D'Amour et al., 2005; Phillips et al., 2007; Johannesson et al., 2009; Pagliuca

et al., 2014; Pezzolla et al., 2015; Russ et al., 2015; Rezania et al., 2014; Soria et al., 2000). Aunque estos estudios ofrecen nuevos métodos para inducir a las CTEs a diferenciarse en células productoras de insulina, emplean una costosa y desconcertante variedad de factores de crecimiento, mitógenos y agentes farmacológicos. Alternativamente, las células pueden ser transfectadas con determinados genes y más recientemente con pequeñas moléculas de RNA reguladoras como son los miRNAs, que tienen un importante papel en gran variedad de procesos celulares y moleculares durante el desarrollo, proliferación, diferenciación, metabolismo y apoptosis (Gangaraju y Lin, 2009; Mathieu y Ruohola-Baker, 2013). Hasta ahora, existen pocos trabajos sobre los efectos promotores del uso combinado de varias de estas técnicas en la diferenciación dirigida de las CTEs *in vitro*, aunque se ha visto que los miRNAs desempeñan importantes funciones reguladoras en estas células, ya sea en el mantenimiento de un estado no diferenciado (Gruber et al., 2014) o siendo capaces de promover la diferenciación hacia diferentes destinos celulares (Stevanato y Sinden, 2014; Shim y Nam, 2016; Kuppusamy et al., 2013).

5.1. Potencial regulador del *pool* de pequeñas moléculas de ncRNA pancreáticas en la diferenciación de las CTEs murinas

Durante la última década numerosos laboratorios, incluido el nuestro, han desarrollado protocolos para dirigir a las células troncales pluripotentes hacia células productoras de insulina que respondan a los estímulos de glucosa. En la mayoría de estas técnicas las células son cultivadas con citoquinas específicas o sobre distintos sustratos (Assady et al., 2001; Jiang et al., 2007a; Van Hoof et al., 2009; Schulz et al., 2012; Rezania et al., 2012; Pagliuca et al., 2014; Pezzolla et al., 2015; D'Amour et al., 2006; Kroon et al., 2008). Dentro de este extenso marco de referencia, los mecanismos bioquímicos que regulan el desarrollo de células pancreáticas ahora pueden ser explorados. Entre los muchos factores que deben coordinarse para regular la diferenciación, pequeñas

moléculas de ncRNAs como son los miRNAs constituyen relativamente una nueva línea de investigación y tienen un gran potencial para dar forma a las futuras terapias de enfermedades como la diabetes. Dado que un solo miRNA puede tener varios RNA diana dentro de una célula, estos pequeños ncRNAs pueden intervenir simultáneamente en múltiples redes post-transcripcionales (Bartel, 2009; Massirer y Pasquinelli, 2006; Van Wynsberghe et al., 2011). En los últimos años se ha puesto de relieve la importancia de los miRNAs en la identidad de células troncales y su diferenciación (Wang et al., 2007; Ivey y Srivastava, 2010; Martinez y Gregory, 2010; Wang et al., 2008; Qi et al., 2009; Marson et al., 2008; Suh et al., 2004), así como en el desarrollo pancreático (Hinton et al., 2010, 2012; Lynn et al., 2007) mediante estudios *knockout* que selectivamente suprimen la expresión de genes esenciales para la biogénesis de los miRNAs. Estos experimentos *knockout* resultaron en una disminución de expresión de los miRNAs, restringiendo de la capacidad de las CTEs para diferenciarse y constituir el tejido endocrino. Sin embargo, las funciones específicas de los miRNAs en el mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales y la diferenciación esta solo comenzando a ser dilucidado.

Como hemos visto al conjunto completo de los miRNAs endógenos, ya sean conocidos o desconocidos, que se expresan en un determinado tipo celular se le conoce como *pool* de miRNAs. Existe una gran cantidad de investigaciones en las que la asociación funcional entre un miRNA individual y su mRNA diana se ha caracterizado; sin embargo, el complejo proceso de cómo este *pool* de miRNAs actúa como un todo regulando la expresión génica sigue siendo relativamente desconocido. Por ello, uno de nuestros primeros estudios consistió en aislar el *pool* de pequeñas moléculas de RNA específicas de islotes pancreáticos y analizar el posible efecto que puede tener en la diferenciación de las CTEs.

Este estudio se llevó a cabo utilizando islotes pancreáticos aislados del páncreas de ratones C57BL/6J para la obtención del *pool* de miRNAs de este tipo celular y las CTEs

murinas de la línea ES-D3. Esta línea celular cultivada *in vitro* mantiene sus características de pluripotencia mediante las condiciones adecuadas de cultivo, como es la presencia de la citoquina LIF en el medio, lo que viene corroborado tanto por la morfología celular típica de estas células como por la expresión génica de marcadores de pluripotencialidad que incluye a *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*, así como su correspondiente expresión proteica. Las CTEs tienden a diferenciarse de manera espontánea a cualquiera de los linajes de las capas primarias embrionarias en condiciones de cultivo definidas (Gadue et al., 2005; Keller, 2005; Poh et al., 2014). Sin embargo el endodermo, es por su disposición en el embrión, una capa embrionaria compleja de obtener *in vitro* por la necesidad de multitud de contactos con otras capas o estructuras embrionarias a lo largo del desarrollo *in vivo* (Yamamoto et al., 2004; Zorn y Wells, 2009). A pesar de ello numerosos trabajos publicados han ido proliferando para la obtención de células pancreáticas provenientes de esta capa. Estos trabajos previos describen la inducción de la diferenciación de las CTEs hacia células precursoras de los tejidos derivados del endodermo mediante protocolos adecuados de diferenciación que permiten derivar unas células especializadas a partir de células troncales (Kim et al., 2010; Shi et al., 2005; Schroeder et al., 2006; Liu y Lee, 2012). Por la experiencia en nuestro laboratorio sabemos que los protocolos para la línea celular ES-D3 no parece dirigir fácilmente hacia el endodermo pancreático o linajes más maduros, debido posiblemente a que aunque todas las líneas de las CTEs por definición poseen el mismo potencial de diferenciación no todas son capaces de diferenciarse hacia un único linaje, de forma que proporcionan un rendimiento diferente a la hora de obtener un determinado tipo celular.

Por ello, este estudio se centró principalmente en la regulación de la expresión génica mediada por el *pool* de miRNAs pancreáticos y cómo puede afectar al potencial de diferenciación de las CTEs. La regulación de la expresión génica por los miRNAs es un proceso complejo, un miRNA puede tener el potencial para regular unos pocos o un gran número de genes diferentes, asimismo un gen puede tener potencial de ser la diana de múltiples miRNAs (Hua et al., 2006; Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008; He

et al., 2010; Ameres y Zamore, 2013; Mu et al., 2016; Bai et al., 2015). Tradicionalmente los estudios están enfocados en los efectos de un solo miRNA en la regulación de la expresión génica, pero mientras que centrarse en el estudio de las interacciones individuales miRNA-RNA proporciona una gran cantidad de información con respecto a la regulación de genes, estos enfoques no logran captar los efectos que un completo *pool* de miRNAs tiene sobre la regulación de la expresión génica en la célula. Por ello, en esta investigación se estableció un método para estudiar el potencial regulador del *pool* de miRNAs. En un intento de simplificar este proceso complejo, lo primero que se examinó fueron los efectos que tiene el *pool* de miRNAs sobre una serie de genes claves en la diferenciación pancreática.

Desde la publicación del trabajo de D'Amour (D'Amour et al., 2005) se estableció un criterio de marcadores génicos aceptados para identificar el endodermo, que incluye una combinación del aumento de expresión de marcadores tales como *SOX17* y *FOXA2*, y una disminución en los marcadores del endodermo primitivo que no se expresan en el endodermo definitivo como *SOX7*, para confirmar la producción del endodermo definitivo. En este estudio, la activina A y el ácido retinoico inducen la producción del endodermo definitivo en las CTEs cuando son cultivadas con bajo contenido de suero durante un período prolongado de tiempo, como se evidencia por la expresión de *SOX17* y *FOXA2*. Esta observación concuerda con estudios previos que indican que la activina A y el ácido retinoico desempeñan un papel importante en el desarrollo del páncreas dorsal murino (Xu et al., 2011; Wiater y Vale, 2012; Molotkov et al., 2005; Huang et al., 2014) e inducen endodermo *PDX1*-positivo en la diferenciación de las CTEs (Micallef et al., 2005; Johannesson et al., 2009; Frandsen et al., 2007). Evidencias adicionales de que el ácido retinoico facilita este proceso de diferenciación es la observación de que el bFGF se une a receptores transmembrana y juega un papel clave en la embriogénesis murina, incluyendo el desarrollo del páncreas y el hígado, así como en promover la formación del endodermo y la diferenciación de las células hacia el linaje pancreático (Deutsch et al., 2001; Szebenyi y Fallon, 1999; Chen et al., 2012). La

vía de señalización FGF se asocia también con un papel importante en el desarrollo del páncreas exocrino (Delaspre et al., 2013; Miralles et al., 1999) y en el mantenimiento de la función de las células beta pancreáticas de adultos (Hart et al., 2000). Por tanto, se ha demostrado que el bFGF es un factor importante en el desarrollo del páncreas y el mantenimiento de la función de las células beta pancreáticas, por lo que se trata de una vía de señalización ampliamente utilizada para promover la diferenciación del páncreas (Ameri et al., 2010; Sui et al., 2012; Xu et al., 2011).

La nicotinamida es una poli (ADP-ribosa) inhibidor de la polimerasa utilizada para preservar la viabilidad y función de los islotes pancreáticos (Kolb y Burkart, 1999), representa un factor extrínseco utilizado comúnmente en muchos protocolos de inducción. Ya en la década de 1990 (Otonkoski et al., 1993) se encontró que el tratamiento de las células pancreáticas fetales humanas con nicotinamida dio lugar a un progresivo aumento del contenido de insulina y de la expresión de genes asociados con el desarrollo de células beta pancreáticas de grupos de células epiteliales no diferenciadas. Más recientemente, muchos estudios utilizan nicotinamida en sus protocolos con diferentes tipos de células troncales para la diferenciación hacia células productoras de insulina *in vitro* (Chao et al., 2008; Sun et al., 2007; Segev et al., 2004; Liu y Lee, 2012). La laminina es otro factor destacado en el desarrollo pancreático como indica un estudio que revela su implicación en promover la diferenciación de las células beta pancreáticas de ratones fetales (Jiang et al., 1999), además se ha visto que mejora la diferenciación con el aumento de la insulina y su liberación en respuesta a la concentración elevada de glucosa (León-Quinto et al., 2004; Lin et al., 2010; Lumelsky et al., 2001; Liu y Lee, 2012). Por ello, utilizamos estos factores junto con el *pool* de miRNAs pancreáticos con el objetivo de mejorar tanto el proceso de diferenciación y obtención de progenitores pancreáticos como su maduración.

Durante el desarrollo normal, las células beta pancreáticas maduran después de la formación del endodermo definitivo y la liberación de insulina sensible a glucosa es una

de las características fundamentales de las células beta pancreáticas maduras. Como hemos visto la expresión de marcadores del endodermo definitivo se incrementó a lo largo del protocolo de diferenciación, pero además los niveles de expresión de varios marcadores indicativos de la diferenciación pancreática, incluyendo Nkx6.1, Neurog3, Pax6 e Insulina (Ins-I) también aumentaron, mientras que la expresión de Pdx1, un regulador de la transcripción que juega un papel crítico en la especificación del páncreas y su desarrollo, igualmente se vio claramente favorecida. Por otra parte, no observamos una expresión aparente de marcadores exocrinos como Ptf1a, Mist1, Ppy, Sst, Amy2a5 o Ctrb1 que codifican para factores de transcripción claves para la diferenciación acinar y enzimas digestivas características del componente exocrino del páncreas (Pin et al., 2001; Beres et al., 2006; MacDonald et al., 2010).

En conjunto, estos datos sugieren que el protocolo de diferenciación promovió la inducción progresiva de las CTEs murinas hacia el endodermo definitivo y progenitores pancreáticos, así como el *pool* de miRNAs pancreático facilitó la diferenciación de estos últimos para dar lugar a células productoras de insulina. Sin embargo, es importante destacar que una disminución en los marcadores de pluripotencia característicos de las CTEs murinas, así como de marcadores expresados en otras capas germinales como son el ectodermo y mesodermo, sugeriría que un protocolo particular es capaz de inducir la diferenciación eficientemente y enriquecer la población celular de células del linaje endodérmico pancreático deseado. En nuestro estudio, efectivamente observamos niveles mínimos de expresión de Oct4 y Brachyury lo que sugiere una eficaz inducción de la diferenciación y que no hubo producción significativa de tejidos mesodérmicos; Sin embargo, se identificó un aumento de expresión de Sox1 que se trata de un marcador neuroectodérmico, manifestando que la población resultante fue heterogénea en la que no todas las células expresaban características del tejido pancreático.

A pesar de que el cultivo no era totalmente homogéneo evaluamos la capacidad de las células para liberar insulina en respuesta a estímulos de glucosa, como proceso

representativo de la maduración celular, ya que las células beta pancreáticas adultas maduras se definen funcionalmente por su rápida respuesta a los estímulos producidos por alteraciones en los niveles de glucosa. Se observó una liberación de insulina inducida por glucosa respecto a las células diferenciadas de forma dirigida, coherente con la existencia de un pequeño subconjunto de células productoras de insulina. Sin embargo, el aumento progresivo de los niveles de glucosa no siempre se tradujo en el correspondiente aumento en la liberación de insulina, ya que solo las células diferenciadas y tratadas con el *pool* de miRNAs mostraron una respuesta inicial, aunque esta mejora no se vio reflejada con elevados niveles de glucosa. Por tanto, la capacidad de respuesta a la glucosa fue menor de lo esperado, estos resultados parecen indicar que el *pool* de miRNAs mejoró la liberación de insulina mediada por glucosa, algo que deberá ser corroborado con la experimentación en modelos animales de ratones diabéticos.

En resumen, el protocolo de diferenciación de las CTEs murinas que se describe en este estudio dio lugar a la generación de células que muestran características del endodermo definitivo. Hay una producción de un pequeño número de población heterogénea de células que expresan características de los tejidos pancreáticos; Sin embargo, la mayoría de las células parecen estar en una etapa de precursor endocrino pancreático. Respecto al *pool* de miRNAs parece inducir una mejora en la diferenciación de las células como muestran los datos de expresión de genes marcadores pancreáticos y liberación de insulina, lo que nos indica que la combinación de protocolos de diferenciación con la elección de un conjunto adecuado de específicos miRNAs puede constituir una estrategia efectiva para inducir la diferenciación pancreática en células troncales. Por tanto, fueron necesarios más estudios para dilucidar el papel de los miRNAs claves en la especificación de páncreas y su uso en estrategias basadas en miRNAs para la obtención de células productoras de insulina que respondan eficazmente a los estímulos de glucosa.

5.2. Los miRNAs pancreáticos

La percepción del papel del ncRNA ha cambiado mucho en las últimas décadas, de modo que aquello considerado en gran medida como un DNA "basura" se entiende ahora como un material génico capaz de desempeñar un importante papel regulador dentro de la célula en procesos esenciales de la biología celular, incluyendo la diferenciación y supervivencia (Yamakuchi et al., 2008; Melton et al., 2010). Acorde a la versión 21 de la base de datos online de miRNAs se han registrado 2.588 miRNAs diferentes en humanos. Como ya hemos comentado el hecho de que los miRNAs posean múltiples dianas incrementa enormemente el número de genes diana potenciales y las rutas afectadas. Por lo que no es sorprendente que muchos miRNAs hayan sido implicados en la diabetes y sus complicaciones (Fernandez-Valverde et al., 2011; Kantharidis et al., 2011). El área de estudio de los miRNAs evoluciona rápidamente, diversos experimentos acerca del perfil de miRNAs se han realizado para determinar su expresión en varios tejidos y estos estudios han arrojado un atlas de expresión de miRNAs en mamíferos (Landgraf et al., 2007) y su perfil de expresión específico de tejido en diferentes especies (Hausser et al., 2009). En los últimos años, numerosos estudios se han realizado en células de insulinoma empleadas como modelo de estudio de células pancreáticas (MIN6, INS-IE, β TC6...), células beta pancreáticas o islotes pancreáticos (Hennessy et al., 2010; Baran-Gale et al., 2013; Klein et al., 2013; Tattikota et al., 2013). Esta tendencia generalizada pone en relieve el interés por conocer el perfil de expresión característico de miRNAs en los diferentes tipos celulares y tejidos, y este incremento del conocimiento ha puesto de manifiesto un determinado enriquecimiento de los miRNAs en los islotes pancreáticos y las células beta pancreáticas, lo que se ha asociado con un importante papel en el desarrollo y la biología de los islotes pancreáticos.

Nuestro análisis de expresión de miRNAs llevado a cabo tanto en tejido pancreático en su conjunto como más específicamente en los islotes pancreáticos aislados, reveló la existencia de diversos miRNAs expresados preferentemente en el páncreas como son

varios miembros de la familia let-7 (let-7a/b/d/f), miR-16, -21, -34a o -204 y un enriquecimiento específico en células de los islotes pancreáticos que incluye a miR-7, -15a/b, -16, -29a/b/c, -30d, -148a, -195, -200a/c, -375 y -376a (**Tabla 17**).

miRNA	Función célula beta pancreática	Dianas sugeridas	Referencias
let-7	Regula la señalización de insulina.	IRS2	(Gurung et al., 2014)
miR-7	Regula la secreción de insulina. Inhibe rutas apoptóticas. Interviene en proliferación de células beta pancreáticas y la diferenciación.	SNARE mTOR PAX6 IGF1R	(Latreille et al., 2014; Wang et al., 2013a; Joglekar et al., 2009; Wei et al., 2013; Kredo-Russo et al., 2012a; Nieto et al., 2012; Correa-Medina et al., 2009; Bravo-Egana et al., 2008; Kredo-Russo et al., 2012b)
miR-15a/b	Induce biosíntesis insulina y rutas apoptóticas. Alteración de la diferenciación y el desarrollo. Reducción del número de células endocrinas.	UCP2 BCL2 NEUROG3	(Joglekar et al., 2007; Tarasov et al., 2007; Sun et al., 2011)
miR-16	Reducción del número de células endocrinas.	NEUROG3	(Joglekar et al., 2007)
miR-29a/b/c	Interviene en el transporte de glucosa. Inhibe la GSIS. Induce rutas apoptóticas.	SNARE AKT OC-2 MCT1 STX1A MCL1 INSIG1 CAV2 PI3K	(Pullen et al., 2011; Baran-Gale et al., 2013; Bagge et al., 2013, 2012; Roggli et al., 2012)
miR-30a/d	Regula la expresión de insulina. Interviene en la glucotoxicidad. Inhibe rutas apoptóticas	NEUROD1 TNFα MAP4K4	(Kim et al., 2013; Tang et al., 2009; Zhao et al., 2012)
miR-148a	Induce la expresión de insulina.	ABCA1 BHLHE22 SOX6	(Kang et al., 2013; Melkman-Zehavi et al., 2011)

miR-195	Favorece la regeneración pancreática. Interviene en el desarrollo páncreas.	NEUROG3 (Bolmeson et al., 2011; Joglekar et al., 2007)
miR-200a/c	Induce la expresión de insulina y las rutas apoptóticas.	ABCA1 ZEB1 SOX6 BHLHE22 DNAJC3 JAZF1 RPS6KB1 (Filios et al., 2014; Belgardt et al., 2015)
miR-204	Disminuye la expresión de insulina.	MAFA (Xu et al., 2013)
miR-375	Disminuye la expresión de insulina y la GSIS. Incrementa la proliferación de células beta pancreáticas. Interviene en el desarrollo y diferenciación del páncreas.	PDX1 MTPN HNF1β (Smalheiser y Torvik, 2005; Lund et al., 2004; Czech et al., 2009; Lim et al., 2005; Wang et al., 2008; Qi et al., 2009; Xu et al., 2009; Wellner et al., 2009; Tay et al., 2008a)
miR-376	Inhibe rutas apoptóticas.	IAPP

TABLA 17. Lista de los miRNAs identificados con significativa relevancia en la biología y el desarrollo de células beta pancreáticas.

Mucho de los miRNAs identificados están en concordancia con otros estudios publicados que han examinado los miRNAs durante la organogénesis del páncreas y un número considerable de ellos se han asociado con el desarrollo de células beta pancreáticas al afectar a la proliferación o diferenciación como miR-7 (Wang et al., 2013a), miR-375 (Poy et al., 2009), miR-124a (Baroukh et al., 2007), miR-24 (Vijayaraghavan et al., 2014), let-7a (Gurung et al., 2014), miR-26a (Fu et al., 2013), miR-184 (Tattikota et al., 2014), miR-195, -15 y -16 (Joglekar et al., 2007).

El papel de los miRNAs durante el desarrollo embrionario es particularmente evidente en ratones *knockout* que carecen de alguno de los distintos genes claves de procesamiento de los miRNAs como Dicer, DGCR8, Drosha o Ago2. Estos ratones *knockout* mueren durante la gestación temprana con graves defectos del desarrollo (Bernstein et al., 2003; Fukuda et al., 2007; Morita et al., 2007; Wang et al., 2007;

Shekar et al., 2011). Para mejorar nuestro conocimiento, la primera publicación que mostró como la expresión de los miRNAs es necesaria para la organogénesis pancreática fue publicada en 2007; utilizando un transgénico *PDX1-Cre* en el que se delecta la proteína Dicer que origina la inactivación de la ruta completa de los miRNAs en el conducto pancreático temprano de ratones. Estos animales mostraron graves defectos en todo el linaje pancreático donde las células endocrinas y especialmente las células beta pancreáticas productoras de insulina fueron disminuidas drásticamente, lo que sugiere la importante implicación de los miRNAs en el desarrollo del páncreas.

Por otro lado, la función más importante de las células beta pancreáticas es la producción y secreción de insulina, y los miRNAs intervienen en diferentes funciones claves de este proceso. En las células beta pancreáticas deficientes en la proteína Dicer, las cuales exhiben un defecto general en el procesamiento de los miRNAs, se produce una pérdida de expresión de insulina (Melkman-Zehavi et al., 2011). Un estudio posterior demostró como la pérdida de Dicer en células progenitoras endocrinas resulta en una especificación normal del destino endocrino, aunque los islotes pancreáticos aparecen desorganizados, la expresión de insulina está disminuida y los mutantes presentan hiperglicemia neonatal (Kanji et al., 2013). En un estudio previo la actividad de Dicer fue anulada en las células beta pancreáticas diferenciadas, resultando también en una pérdida de la expresión de insulina (Kalis et al., 2011).

Todo esto pone en evidencia la necesidad de determinados miRNAs para la correcta síntesis de insulina y dada la importancia de una respuesta de la insulina controlada, no es de extrañar que este proceso se controle a un nivel adicional por estos miRNAs. Se ha visto que normalmente los miRNAs tienen un efecto inhibitorio de la exocitosis de insulina, lo que parece sugerir que el principal objetivo en las células beta pancreáticas adultas es prevenir cualquier secreción excesiva de insulina e hipoglucemia potencialmente mortal.

5.3. Implicación de los miRNAs en las Células Beta Pancreáticas

Una vez se ha culminado el desarrollo de los islotes pancreáticos se ha visto como el funcionamiento de las células beta pancreáticas maduras puede ser regulado por la acción de diversos miRNAs que controlan tanto la producción como la secreción de insulina a través de la regulación de dianas claves en la maquinaria exocítica de secreción (Poy et al., 2004; Latreille et al., 2014; Lovis et al., 2008; Sun et al., 2011; Pullen et al., 2011; Melkman-Zehavi et al., 2011; Chakraborty et al., 2014; Baroukh y Van Obberghen, 2009). Por tanto, resulta obvio considerar que estos miRNAs constituyen un componente importante en la maduración de las células beta pancreáticas (**Figura 49**).

La insulina se produce en las células beta pancreáticas a través de la transcripción del gen de la insulina, la traducción en pre-proinsulina y el empaquetamiento en forma de gránulos en el aparato de Golgi como proinsulina. En el transporte a la membrana plasmática, la proinsulina se escinde en insulina y péptido C mediante las endopeptidasas PC1/3 y PC2 (Uchizono et al., 2007). Muchos estudios han identificado varios miRNAs que afectan a la biosíntesis de la insulina a diferentes niveles. En este sentido, miR-7 es uno de los miRNAs destacados que en los últimos años se ha visto que presenta una alta y específica expresión en el páncreas endocrino de pez cebra, ratón y humanos (Wienholds et al., 2005; Bravo-Egana et al., 2008; Correa-Medina et al., 2009). El precursor de miR-7 es codificado por diferentes loci (7-1, 7-2 y 7-3 en humanos y 7a-1, 7a-2 y 7a-3 en ratones), estos últimos son inducidos por *NEUROD1* en células MIN6 (Kredo-Russo et al., 2012b). Se le ha relacionado con la función de células beta pancreáticas regulando la secreción de insulina a través de dianas claves en la fusión vesicular y proteínas SNARE, así como en proteínas implicadas en el tráfico vesicular, unión a membrana y la reorganización del citoesqueleto. La delección específica de miR-7a-2 en células beta pancreáticas murinas incrementa la secreción de insulina y mejora significativamente la tolerancia a glucosa (Latreille et al., 2014). En modelos diabéticos

murinos, miR-7 es también incrementado y regula negativamente la GSIS (Latreille et al., 2014). Consistente con el incremento en modelos de diabetes murinos y el efecto perjudicial en la GSIS, miR-7 se encontró incrementado en los islotes pancreáticos de cadáveres donantes diabéticos comparado con donantes obesos no diabéticos (Latreille et al., 2014), confirmando el papel de este miRNA en la fisiopatología de islotes pancreáticos humanos.

Otro miRNA destacado que fue uno de los primeros en asociarse con las células beta pancreáticas y que mostró regulación de la secreción de insulina fue miR-375 (Poy et al., 2004). Este miRNA se expresa abundantemente de forma específica en islotes pancreáticos (van de Bunt et al., 2013; Avnit-Sagi et al., 2009) y en células de insulinoma de ratón (Poy et al., 2004). La sobreexpresión de miR-375 disminuye la GSIS a través de la diana miotrofina (Mtpn), una proteína implicada en el transporte vesicular (Li et al., 2010), que dará lugar a una disminución de la exocitosis de insulina independiente de la señalización del calcio intracelular (Poy et al., 2004). Además, miR-375 se ha relacionado con una disminución de la expresión del gen de la insulina a través de su diana *PDX1* en células INS-1E (El Ouaamari et al., 2008). Sin embargo, no se ha visto reflejado con la sobreexpresión de miR-375 en las CTEs (HS181), ni en otros estudios que sugieren diferentes genes importantes durante el desarrollo celular incluyendo a Hnf1 β , Sox17, Gata6 y Pax6, de los cuales solo Hnf1 β ha sido verificado (Wei et al., 2013), lo que puede sugerir un distinto papel de los miRNAs en células diferenciadas totalmente maduras donde el papel más importante de miR-375 en la célula beta adulta estaría encaminado a mantener una respuesta exocitótica adecuada, respecto a las células en desarrollo que no han alcanzado aún su estado funcional. Otros miRNAs que se han descrito como reguladores de la GSIS son miR-130a, -200 y -410. La inhibición de estos miRNAs parece disminuir la GSIS en células MIN6, aunque la más que probable implicación de múltiples miRNAs en este proceso hace que sea difícil asignar las funciones definitivas de cada miRNA individual (Hennessy et al., 2010).

Varios miembros de la familia miR-30 parecen desempeñar un papel importante en la secreción de insulina. Uno de estos miembros como es miR-30a, se encontró incrementado en condiciones de alta glucosa y suprime directamente la expresión de *NEUROD1* como una etapa de iniciación importante de disfunción de las células beta pancreáticas inducida por glucotoxicidad (Tang et al., 2009). Se ha descrito también que la sobreexpresión de miR-30d incrementa la expresión del gen de insulina en células MIN6 e islotes pancreáticos murinos, a través del factor Mafa (Tang et al., 2009; Zhao et al., 2012), aunque no se conoce la diana directa que mediaría en este efecto.

Otra familia importante de miRNAs en la secreción de insulina es la formada por miR-29a/b/c, la cual ha sido asociada por múltiples estudios con la regulación de la secreción de insulina en las células beta pancreáticas mediante la unión directa a la syntaxina-1, una proteína SNARE implicada en la exocitosis de insulina (Bagge et al., 2013). En respuesta a estímulos de glucosa en células INS-1E, células beta pancreáticas e islotes pancreáticos humanos y murinos se produce un incremento de miR-29 (Bagge et al., 2012) y la correspondiente disminución de la syntaxina-1 conlleva efectos negativos sobre la GSIS. La sobreexpresión de miR-29 en células MIN6 y en islotes pancreáticos murinos disociados da lugar a una disminución similar sobre la GSIS y se produce junto con una disminución en el factor OC-2, uno de las dianas predichas de miR-29 que regula negativamente la expresión de granofilina (Roggli et al., 2012). Algunos miembros de la familia miR-29 (miR-29a/b) se han relacionado también con la inhibición del transportador de monocarboxilato (Mct1) (Pullen et al., 2011) y dado que la relación ATP/ADP es crucial para la secreción de insulina, el efecto de la unión a Mct1 que permite la circulación de piruvato al interior de la célula beta pancreática puede tener un papel clave en el efecto de miR-29 sobre la detección de glucosa y posterior secreción de insulina.

Obviamente, la función de células beta pancreáticas requiere un apropiado control no solo de la secreción de insulina, sino que también de la producción de la insulina y

ambos procesos afectan al desarrollo de la diabetes. Entre los miRNAs que identificamos en las muestras analizadas encontramos una serie de miRNAs que recientemente se ha descrito su capacidad para modular la producción de insulina, ya sea inhibiendo la transcripción de la biosíntesis de insulina como miR-204 (Xu et al., 2013) o incrementándola como miR-15, -26, -148 y -182 (Melkman-Zehavi et al., 2011; Sun et al., 2011).

Uno de los primeros miRNAs asociados con la diabetes fue miR-204, que presenta un claro aumento de expresión como consecuencia de una sobreexpresión de la proteína pro-diabética TXNIP en células INS-1. Este aumento de expresión es generalizado en múltiples modelos de diabetes y su interacción con el factor MafA produce su inhibición con la consecuente disminución en la producción de insulina de células INS-1 e islotes pancreáticos humanos.

Por el contrario, el contenido de insulina puede ser promovido mediante la interacción de otros miRNAs con represores transcripcionales. Después de encontrar que la disminución global de los miRNAs mediante un sistema inducible da lugar a un fenotipo diabético y una disminución de los niveles de insulina, el papel de algunos miRNAs expresados abundantemente en células beta pancreáticas fue investigado. Entre ellos, la inhibición de miR-24, -26, -148 y -182 resultó en una disminución de los niveles del mRNA de insulina en islotes pancreáticos primarios (Melkman-Zehavi et al., 2011). Este efecto fue asociado al menos parcialmente a la desactivación de determinados represores transcripcionales de la insulina como Sox6 que interfiere con la activación transcripcional de Pdx1 (Iguchi et al., 2005) y Bhlhe22 que puede actuar como regulador negativo de NeuroD1 (Peyton et al., 1996). Por otro lado, miR-24 también interacciona con genes relacionados con la aparición de diabetes como son NeuroD1 y Hnf1 α e inhibe la secreción de insulina y la proliferación de células beta pancreáticas (Zhu et al., 2013). Otro miRNA implicado en el aumento de la biosíntesis de insulina es miR-15a, cuya sobreexpresión induce la producción de insulina en islotes pancreáticos murinos,

posiblemente mediante interacción con UCP2 que a su vez altera la relación ATP/ADP. Llama la atención también que en condiciones de alta glucosa se incrementan los niveles de miR-15a a corto plazo, sin embargo, la exposición prolongada a estas condiciones de alta glucosa disminuye el nivel de miR-15a, asociándose con la glucotoxicidad que aparece por los efectos adversos que produce la hiperglucemia crónica (Sun et al., 2011).

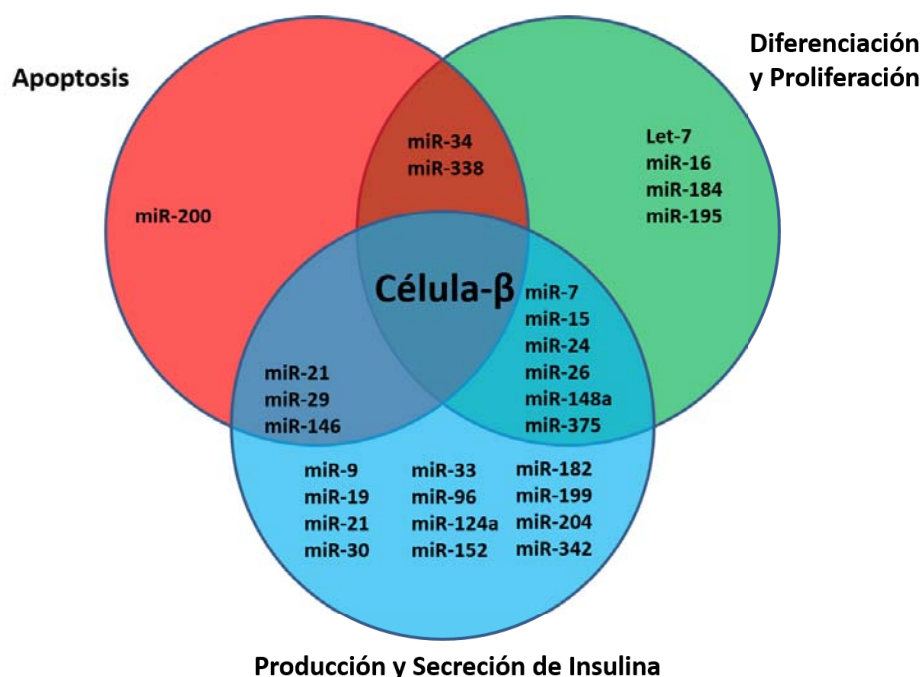


FIGURA 49. Procesos clave de células beta pancreáticas en los que se han identificado miRNAs implicados. Los miRNAs son agrupados en base al actual conocimiento de sus funciones primarias, aquellos con múltiples funciones en células beta pancreáticas se agrupan en el cruce de las secciones del diagrama Venn.

5.4. Los miRNAs y la diferenciación de las CTEs: Implicación en la obtención de células productoras de insulina

La generación de células beta pancreáticas maduras ha sido ampliamente estudiada en una gran variedad de células troncales. En nuestro laboratorio a partir del conocimiento sobre el desarrollo embrionario y los progresos realizados con las CTEs murinas (Soria et al., 2000; León-Quinto et al., 2004; Vaca et al., 2006, 2008; Salguero-Aranda et al., 2016), se consiguió mediante un enfoque por etapas dirigir eficientemente la

diferenciación de las CTEs e iPSC humanas hacia células productoras de insulina simulando las fases del desarrollo de los islotes pancreáticos *in vivo*, a través de la obtención del endodermo definitivo, endodermo pancreático y finalmente la generación de células endocrinas y el enriquecimiento de una masa de células beta pancreáticas capaz de secretar insulina y péptido C (Pezzolla et al., 2015). Un número considerable de miRNAs se han asociado con el desarrollo de células beta pancreáticas al afectar a la proliferación o diferenciación y no sorprende que muchos de ellos también se hayan asociado con la función de células beta pancreáticas maduras. Sin embargo, los perfiles de expresión y el papel de los miRNAs en el proceso son poco conocidos y en algunas ocasiones contradictorios (Rosero et al., 2010). Por esta razón, la implicación de los miRNAs en la diferenciación de los islotes pancreáticos y cómo pueden actuar los miRNAs debe ser estudiado más a fondo. En el presente estudio, se utilizó una estrategia que simulaba el desarrollo de los islotes pancreáticos humanos *in vivo* mediante un protocolo de diferenciación *in vitro*, en el que los patrones de expresión de genes y proteínas específicas se controlaron durante la diferenciación y posteriormente se detectó la expresión dinámica de los miRNAs, que mostraron un patrón específico-temporal de expresión durante la diferenciación.

Actualmente, está bien reconocido que los intentos de generar células pancreáticas a partir de células pluripotentes debe establecer primero una población del endodermo definitivo, como vimos anteriormente en las células murinas. La activación de las vías de señalización Wnt y Nodal fueron identificadas como suficientes para inducir el endodermo definitivo tanto en el ratón como en las CTEs humanas. En nuestro modelo, las altas concentraciones de activina A se utilizan para simular la función del inductor endodérmico endógeno Nodal, actuando en los mismos receptores y desencadenando una serie de eventos de señalización muy similares. Además de la señalización Activina/Nodal, existe otra vía que desempeña un papel importante en la especificación del endodermo, como es la señalización Wnt. El tratamiento inicial con Wnt3a mejora la eficiencia de la inducción del endodermo definitivo mediante la creación de una

población mesendodérmica progenitora transitoria, a partir de la cual se forman mesodermo y endodermo. La correcta interacción entre ambas vías de señalización, Wnt y TGF- β , resulta crucial para la inducción del endodermo definitivo y posterior generación de progenitores específicos endodérmicos (Toivonen et al., 2013; Hoveizi et al., 2015; Sui et al., 2013; Hay et al., 2008; Guo et al., 2014).

La forma de producirse la segregación del linaje mesendodérmico hacia mesodermo y endodermo actualmente es poco conocida. Los progenitores del mesendodermo activan un programa molecular específico del tipo celular, detectándose una fuerte expresión de *FOXA2* y *SOX17* en el nascente endodermo definitivo. Estudios *Knockout* revelan que ambos son cruciales para determinar el destino celular y reguladores principales de la diferenciación hacia el endodermo definitivo (Kanai-Azuma et al., 2002; Burtscher y Lickert, 2009). La expresión de marcadores del endodermo definitivo incluyendo *SOX17*, *FOXA2* y *GSC* fueron confirmados por qPCR e IF. Una vez establecido el endodermo definitivo, los signos morfológicos de la organogénesis *in vivo* son evidentes en el tubo del intestino primitivo. El endodermo modela su patrón específico mediante una completa interacción entre mesodermo y endodermo en el que están implicados un gradiente de FGFs, BMPs, ácido retinoico y la vía de señalización Shh (Zaret, 2001; Cardoso y Lü, 2006; Shannon y Hyatt, 2004). Las vías de señalización RA y FGF, interaccionan para modular el patrón endodérmico apoyando la especificación del páncreas (Duester, 2008), de modo que la optimización de la sincronización y la concentración del ácido retinoico y los FGFs, es requerida para la obtención del esbozo pancreático del intestino anterior. El ácido retinoico juega un papel crucial poco después de la gastrulación en el patrón endodérmico y en la inducción de la expresión de *PDX1* en los progenitores pancreáticos de varios organismos, desde *Xenopus* a los seres humanos, lo que indica la conservación de su actividad durante la evolución del desarrollo embrionario (Stafford et al., 2004; Martín et al., 2005; Oström et al., 2008). El papel del ácido retinoico fue evaluado durante la diferenciación de las CTEs humanas demostrando ser relevante en la inducción de la expresión de genes pancreáticos con

unos niveles notables de *PDX1*, un factor esencial para el desarrollo de páncreas, siendo parte de esta actividad mediada también por FGFs a través de la señalización ERK/MAPK que puede ser inducida por el hrbFGF (Ameri et al., 2010; Mfopou et al., 2010).

In vivo, la actividad de las BMPs generadas por las estructuras adyacentes a los derivados del mesodermo, opera en el endodermo ventral asociándose con la inducción hepática durante el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, los progenitores pancreáticos se encuentran lejos de esta línea media endodérmica donde existe una señalización BMP activa, de modo que la inhibición de esta vía en el endodermo dorsal desempeña una función crucial en la adquisición del destino pancreático (Zaret, 2002; Wandzioch y Zaret, 2009). Por tanto, el tratamiento combinado del ácido retinoico con antagonistas como la nogina para inhibir la vía de señalización BMP fue requerido en este estudio para una fuerte inducción del destino pancreático evitando al mismo tiempo la diferenciación hepática.

El factor *PDX1* requerido para el desarrollo del páncreas se expresa en una región restringida donde la vía de señalización Shh es reprimida, además se demostró que esta vía desempeña también un papel negativo *ex vivo* mediante la limitación de la expresión de genes endocrinos y exocrinos en explantes pancreáticos embrionarios murinos (Mfopou y Bouwens, 2008; Mfopou et al., 2007; Kim y Melton, 1998). Todo esto indica la necesidad de antagonizar con la vía de señalización Shh que se encuentra activa durante la diferenciación de las CTEs, de forma que la exposición a ciclopamina, un alcaloide esteroide que bloquea la vía de señalización Shh, promueve la expansión pancreática. La adición secuencial de los factores hrbFGF, nogina y ciclopamina indujo la especificación del endodermo pancreático a expensas de otros linajes endodérmicos del intestino anterior, como muestra el perfil de expresión de genes pancreáticos. Las células progenitoras pancreáticas se caracterizan por la expresión de un subconjunto de factores de transcripción, entre los que detectamos la expresión combinada de *FOXA2*,

PDX1, *PAX6*, *HNF1B* y *NKX6.1*, confirmando la obtención *in vitro* de unas células progenitoras con capacidad para dar lugar a células productoras de insulina.

Aunque la cascada de factores de transcripción que regula la diferenciación endocrina pancreática ha sido explorada en gran medida, hasta la fecha las señales que desencadenan la maduración de los progenitores constituyen un proceso difícil de alcanzar. Debido a la compleja naturaleza de la diferenciación endocrina pancreática, aún no dilucidada por completo, la generación de células productoras de insulina maduras y funcionales no se ha logrado con la eficiencia necesaria *in vitro*. En nuestro estudio con el fin de simular el entorno real de las células beta pancreáticas en los islotes pancreáticos, las células fueron parcialmente disociadas para posteriormente inducir la formación de *cluster* o agrupaciones celulares tridimensionales similares a la topología de islotes pancreáticos *in vivo*. Hasta el momento para conseguir la maduración se han empleado un gran número de factores como la betacelulina, activina, exendina-4, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), nicotinamida, BMPs, FGFs, ácido retinoico, ITS o fibronectina (Zhang et al., 2009; Jiang et al., 2007a; Oström et al., 2008; Jiang et al., 2007b; D'Amour et al., 2006; Mfopou et al., 2010; Vaca et al., 2008), mientras que nuestro estudio se centró en la maduración de los *clusters* celulares mediante el resveratrol (Pezzolla et al., 2015). La caracterización de las células obtenidas tras esta etapa final, confirmó que fuimos capaces de obtener *clusters* similares a los islotes pancreáticos, que expresan diferentes marcadores de los islotes pancreáticos maduros. Estas células se caracterizan por un perfil de expresión génica propio de células beta pancreáticas maduras (*NKX6.1*, *MAFA*, *GLUT2* e *INS*), la detección por IF de factores de transcripción específicos del desarrollo pancreático (*FOXA2* y *SOX17*) y de hormonas pancreáticas endocrinas (INSULINA y PÉPTIDO-C), así como por respuesta a la GSIS. Además, las células diferenciadas fueron capaces de completar el proceso de maduración y ser funcionales cuando se trasplantaron en ratones diabéticos como se observó en experimentos *in vivo* (Pezzolla et al., 2015).

Mientras que la densidad celular, matriz extracelular, factores de crecimiento y las señales autocrinas y paracrinas que acabamos de describir probablemente actúan como los principales motores del destino celular, los miRNAs juegan un papel crítico al actuar rápidamente para suprimir la expresión de genes que regulan la pluripotencia y linajes no deseados. Por ello, en nuestro laboratorio nos interesamos por estudiar el patrón de expresión global de miRNAs durante las diferentes etapas de diferenciación de las CTEs hacia células productoras de insulina. Los miRNAs pueden regular activamente la diferenciación de las células troncales para convertirse en células del linaje endocrino pancreático, incluyendo las células beta pancreáticas productoras de insulina. Este es un proceso dinámico en el que algunos miRNAs ayudan a mantener la pluripotencia, mientras que otros impulsan las decisiones del destino celular. Así, trabajos previos han descrito que las CTEs poseen un *pool* específico de miRNAs, el cual desempeña un importante papel en la regulación del estado pluripotente y cómo el destino celular puede ser modificado alterando el contenido celular de miRNAs (Cell et al., 2008; Lin et al., 2008). Nuestro análisis revela también una serie de miRNAs expresados preferentemente en las CTEs en estado no diferenciado como es la familia miR-302 y otros miRNAs cuyo perfil de expresión varía activamente durante el proceso de diferenciación (miR-7, -15a/b, -16a, 29b, -148a, -373 y -375). Trabajos pioneros en *Drosophila* sugirieron que una de las funciones de los miRNAs es reprimir mRNAs diana en tejidos en los que no deben expresarse para conferir solidez de la expresión génica (Stark et al., 2005), de forma que es factible pensar que los altos niveles de estos miRNAs expresados durante el proceso de diferenciación suprimen programas específicos de factores de transcripción hacia linajes no deseados.

El mantenimiento de la pluripotencia en las CTEs humanas está bajo el control de la ruta de señalización TGF- β . La activación de la vía de señalización Activina/Nodal de esta ruta afecta a la expresión de un subconjunto de miRNAs en las CTEs, que incluye a un miembro de la familia miR-302 como miR-373. Niveles de expresión apropiados de este miRNA son cruciales para el mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales,

ya que su sobreexpresión conduce a la diferenciación hacia un linaje mesendodérmico (Rosa et al., 2014). Estos efectos podrían estar mediados al menos parcialmente por la represión de *LEFTY*, un inhibidor del ligando Nodal y dado que los genes *LEFTY* son activados por la señalización Activina/Nodal (Shen, 2007), parece ser que una complicada red de circuitos de retroalimentación positiva/negativa que involucra rutas de señalización y la familia miR-302, funcionan cooperativamente con el fin de mantener un delicado equilibrio entre la pluripotencia y la diferenciación de las CTEs. Un componente del núcleo transcripcional regulador de las CTEs como *NANOG*, se encuentra entre los genes activados por Smad2/3, que a su vez se ha considerado como una probable diana de miR-373, aunque no podemos excluir que otras vías participen en la regulación de miR-373 como la vía de señalización Wnt (Rosa et al., 2014; Zhou et al., 2012), implicada tanto en el mantenimiento de la pluripotencia como en la formación del mesendodermo. El nivel de expresión de miR-373 es bajo durante el estado de autorrenovación de las CTEs y se induce durante la diferenciación. Este incremento de expresión en miR-373 inhibe el estado de autorrenovación, reprimiendo la expresión de genes pluripotentes e induciendo el linaje mesendodérmico. Acorde al perfil de expresión observado en nuestro estudio, podemos considerar que una cantidad específica de miR-373 especificado por un nivel discreto de señalización Activina/Nodal debe mantenerse en la célula con el fin de prevenir la diferenciación. La activación de la señalización Activina/Nodal induce la expresión de miR-373 y el circuito de factores de transcripción que a su vez promueve la generación del mesendodermo. Además, los genes *NODAL* y *LEFTY* son positivamente regulados por Smad2/3, por lo que se establece un complejo circuito de retroalimentación positivo/negativo que controla el proceso.

Durante el desarrollo los procesos de proliferación y diferenciación se mantienen en equilibrio y se extienden de manera mutuamente excluyentes. El control post-transcripcional de la expresión génica desempeña un papel clave en este equilibrio mediante la coordinación de la expresión de productos génicos seleccionados en

determinados momentos y lugares precisos. Un estudio para identificar los miRNAs altamente expresados durante el desarrollo pancreático reveló que miRNAs específicos de islotes pancreáticos como son miR-7, -9, -375 y -376, fueron expresados a altos niveles durante la diferenciación de los islotes pancreáticos humanos (Joglekar et al., 2009). Posteriormente, se ha demostrado que miR-7 y -375 son esenciales para el desarrollo de las células beta pancreáticas y su función (Bravo-Egana et al., 2008; Kloosterman et al., 2007; Poy et al., 2009; Lynn et al., 2007). Se ha visto que la masa de células beta pancreáticas es severamente disminuida en ratones deficientes en miR-375 (Poy et al., 2009) y la inactivación de miR-7 también produce una disminución en el número total de células beta pancreáticas, expresión de insulina y tolerancia a la glucosa después del nacimiento (Nieto et al., 2012), lo que sugiere un importante papel de estos miRNAs en la proliferación de las células beta pancreáticas. Se ha descrito que miR-7 es muy abundante en las células endocrinas (Correa-Medina et al., 2009; Bravo-Egana et al., 2008) y su expresión aumenta a lo largo de la progresión del desarrollo y la diferenciación de los islotes pancreáticos humanos (Joglekar et al., 2009), así como en el desarrollo pancreático murino (Nieto et al., 2012). En conjunto, estos resultados sugieren que miR-7 y -375 constituyen importantes miRNAs en la obtención de células productoras de insulina maduras. Interesantemente, en nuestro estudio durante las primeras etapas de diferenciación de las CTEs con el establecimiento del endodermo definitivo se produjo un aumento considerable en la expresión de miR-7 y -375 para luego comenzar a declinar hasta el final de la diferenciación. El aumento de expresión de los niveles de miR-7 y -375 coincidió con el establecimiento del endodermo definitivo presentando un patrón de expresión muy similar a marcadores endodérmicos como *SOX17*, *FOXA2* y *GSC*. La alta expresión de miR-7 y -375 en progenitores del linaje endodérmico sugiere que estos promueven la segregación del linaje mesendodérmico posiblemente mediante la supresión de una inapropiada expresión de factores de transcripción del linaje mesodérmico. Posteriormente, la disminución de expresión en estos miRNAs coincidió con un pronunciado aumento de los niveles de expresión de los

genes progenitores pancreáticos como *PDX1*, *PAX6*, *HNF1 β* y *NKX6.1*, lo que puede reflejar algún mecanismo de regulación indirecta de estos miRNAs sobre tales genes. Por tanto, podemos considerar que miR-7 y -375 actúan durante el establecimiento del endodermo definitivo y la inducción de estas células obtenidas a partir de las CTEs hacia progenitores pancreáticos, algo que estaría en consonancia con estudios previos (Correa-Medina et al., 2009; Nieto et al., 2012). Además, el patrón de expresión dinámico de miR-7 y -375 fue similar al que tiene lugar durante el desarrollo del páncreas fetal humano (Correa-Medina et al., 2009), lo que apoya además que el protocolo de diferenciación utilizado en este estudio se aproxima en gran medida a los acontecimientos ocurridos durante el desarrollo pancreático humano.

La familia miR-15 y -16 se han descrito como atenuadores de la vía de señalización Activina/Nodal a través del receptor de Activina tipo II (*Acvr2a*), mientras que estos mismos miRNAs son regulados negativamente por la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Martello et al., 2007). El perfil de expresión de nuestro estudio concuerda perfectamente con esta observación, ya que la expresión de miR-15a/b y -16 es atenuada en las primeras etapas de diferenciación caracterizadas por la activación de ambas vías de señalización con el fin de generar un linaje mesendodérmico que desemboque en un destino endodérmico. Como ya hemos comentado el proceso de esta segregación no es ampliamente conocido, pero si se ha revelado que la posterior diferenciación en el linaje endodérmico requiere altos niveles de Activina/Nodal, mientras que la diferenciación en el linaje mesodérmico requiere bajos niveles de Activina/Nodal (Kubo et al., 2004; Tada et al., 2005). Por tanto, después del establecimiento del endodermo se inhibe esta vía y cesa la atenuación de miR-15a/b y -16. Por otro lado, durante el desarrollo del páncreas, *NEUROG3* dirige a las células precursoras hacia un destino endocrino y ha sido descrito también una expresión de miR-15a/b, -16 y -195 en el páncreas en regeneración de ratones parcialmente pancreatectomizados, pudiendo existir una interacción con *NEUROG3* (Gradwohl et al., 2000). La inhibición de cada uno de estos miRNAs en la regeneración de tejido

pancreático murino, resultó en un aumento en *NEUROG3*, así como en factores asociados, *NKX2.2* y *NEUROD1*. Por el contrario, la sobreexpresión de estos miRNAs en el desarrollo de explantes de los conductos pancreáticos murinos condujo a una reducción en el número total de células endocrinas, lo que sugiere que estos miRNAs pueden desempeñar un papel importante en el control del desarrollo de los islotes pancreáticos y la diferenciación celular (Joglekar et al., 2007). Por tanto, un bajo nivel de expresión de miR-15a/b y -16 resulta sustancial para la función de las células beta pancreáticas. Nuestros resultados, reflejaron como estos miRNAs atenuados inicialmente, aumentan progresivamente durante las posteriores etapas de diferenciación hasta la generación de los progenitores pancreáticos y sus niveles se reducen drásticamente con la maduración de los progenitores para dar lugar a células productoras de insulina, lo que sugiere que probablemente desempeñen algún papel importante para la generación de los progenitores pancreáticos, sin embargo su expresión debe ser declinada para la maduración y proliferación de las células endocrinas.

La familia miR-29 está constituida por miRNAs expresados altamente en células beta pancreáticas maduras (Larsen et al., 2011; Pullen et al., 2011; Baran-Gale et al., 2013), relacionados fundamentalmente con los procesos de producción y secreción de insulina. Aunque también se ha visto que en células INS-1E la sobreexpresión de miR-29 induce la proliferación de las células beta pancreáticas, mientras que en los islotes pancreáticos de ratones diabéticos la disminución de los niveles de expresión de miR-29 se corresponde con una gran disminución en la proliferación de células beta pancreáticas (Bagge et al., 2012). Dada la relación de la familia miR-29 con la proliferación de células beta pancreáticas el incremento observado al final de la diferenciación parece ser razonable y podría estar actuando durante la diferenciación de los progenitores pancreáticos a células productoras de insulina. Por otro lado, se ha descrito que miR-29 interviene también reprimiendo la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Yang et al., 2013). Además, la expresión de miR-29 es regulada por *FOXA2* (Kurtz et al., 2014), un

factor necesario para la inducción del endodermo, pero que a su vez es regulado por la insulina (Wolfrum et al., 2003) y se opone a la acción de esta (Puigserver y Rodgers, 2006). Estas observaciones pueden explicar la disminución observada en la expresión de miR-29 en las etapas iniciales de diferenciación y su posterior aumento durante la etapa de maduración de los progenitores pancreáticos hacia células productoras de insulina.

La biosíntesis de insulina es estimulada por miR-148a a través de la inhibición de represores transcripcionales, sin embargo también se ha relacionado con la atenuación de la vía de señalización Shh (Liu et al., 2015), un proceso importante para la expansión de los progenitores pancreáticos. Para ello, miR-148a suprime la expresión del gen *Gas1* el cual codifica un receptor de membrana que facilita la vía de señalización Shh (Jin et al., 2015). Nuestro estudio revela un aumento progresivo de miR-148a, alcanzando niveles de expresión relevantes con la etapa de expansión de progenitores pancreáticos inducida por la atenuación de la vía de señalización Shh y la etapa de maduración para obtener células productoras de insulina.

5.5. Utilidad de los miRNAs en la diferenciación pancreática de las CTEs

Muchos investigadores están desarrollando activamente protocolos y métodos eficientes para la diferenciación pancreática a partir de diversos tipos de células troncales. Estos protocolos y métodos como hemos detallado se basan en la función de múltiples genes y diversos factores, prestando especial atención a las pequeñas moléculas que están implicadas en la diferenciación de las células pancreáticas humanas; No obstante, es difícil de recapitular el desarrollo de páncreas *in vitro* y una de las principales problemáticas recalca en la producción de células productoras de insulina maduras que respondan a los secretagogos adecuados y posean todas las características de las células beta pancreáticas humanas adultas, de forma que hasta el momento la mayoría de protocolos de diferenciación *in vitro* producen células endocrinas pancreáticas multihormonales que coexpresan glucagón e insulina, lo que

sugiere un tipo de célula inmadura (Jiang et al., 2007a; Nostro et al., 2011; Rezania et al., 2011; D'Amour et al., 2006).

Una estrategia alternativa para promover la maduración de las células productoras de insulina es el trasplante de progenitores pancreáticos derivados de las células troncales, lo que permite que se produzca la maduración *in vivo*. Injertos de *clusters* celulares similares a los de los islotes pancreáticos fetales humanos maduraron satisfactoriamente en células productoras de insulina sensibles a glucosa en ratones (Hayek y Beattie, 1997), sugiriendo que podría ser una estrategia válida en células diferenciadas a partir de las CTEs. Los primeros estudios que utilizaron este enfoque describieron una mejoría en la hiperglucemia inducida por STZ tras el trasplante de células productoras de insulina obtenidas a partir de células troncales. Sin embargo, el péptido C circulante bien no fue medido (Shim et al., 2007) o fue demasiado bajo para ser clínicamente relevante (Jiang et al., 2007b). Además, aunque se detectaron células positivas para péptido C en los injertos renales, estos no constituían células beta pancreáticas maduras, ya que expresaban múltiples hormonas y no expresaron de manera uniforme marcadores cruciales de las células beta pancreáticas maduras (Shim et al., 2007; Jiang et al., 2007b). La empresa ViaCyte proporcionó evidencias convincentes de la madurez de las células beta pancreáticas *in vivo*, con la secreción del péptido C en respuesta a la glucosa y células monohormonales positivas para insulina que coexpresaban marcadores claves como *PDX1*, *NKX6.1*, *AFP* y las enzimas de procesamiento (Kroon et al., 2008). Este estudio y un reciente seguimiento (Kelly et al., 2011) representaron avances importantes para el campo, pero también plantearon preguntas acerca de la aplicabilidad clínica del trasplante de una población mixta de células inmaduras obtenidas a partir de las CTEs, constituida por diferentes tipos celulares pancreáticos (Bruin et al., 2016; Soria et al., 2016). Por un lado, un gran porcentaje de los ratones trasplantados con los progenitores pancreáticos desarrollaron teratomas y por otro no demostraron la maduración de las células en un entorno diabético preexistente, sino que se mostró que una vez madura sus células impedían la

hiperglucemia inducida por STZ, un escenario que no se produce clínicamente (Kroon et al., 2008).

Otros grupos de investigadores han intentado repetir el protocolo de diferenciación de D'Amour (D'Amour et al., 2006) con diferentes líneas celulares, pero bien no han conseguido generar células pancreáticas endocrinas o se generaron células con una baja eficiencia. Esto es probablemente un reflejo de la variabilidad entre las diversas líneas de células troncales pluripotentes y los protocolos utilizados para su diferenciación. Sin embargo, como ya hemos descrito nuestro laboratorio ha conseguido desarrollar un protocolo de diferenciación para la producción con éxito de células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs e iPSCs *in vitro* con alta eficiencia. Se trata de células funcionales que expresan *MAFA*, *PDX1*, *NKX6.1* y los marcadores clave de las células beta pancreáticas maduras, además de mostrar una satisfactoria respuesta a la GSIS, aunque esta no llega a ser tan eficiente como la de células beta pancreáticas en los islotes pancreáticos humanos durante incubaciones estáticas *in vitro*. Puesto que los ensayos dinámicos de la GSIS relevaban similitudes pero también diferencias entre las células productoras de insulina obtenidas y las células beta pancreáticas primarias humanas, especialmente en la capacidad de las células para adaptarse a cambios rápidos en los niveles de glucosa. Por tanto, son células que pueden responder a los estímulos de glucosa, aunque con una cinética alterada, lo que indica un estado de maduración mejorado relativo a protocolos previos, pero aun con una inmadurez funcional con respecto a las células beta humanas adultas, siendo susceptibles de ser sometidas a procesos que mejoren su funcionalidad.

Nuestro estudio del perfil de expresión de miRNAs nos permitió identificar el *pool* característico de las líneas de células troncales empleadas (HS181 y MSUH-001), aunque nos hemos centrado en la identificación de los transcritos y miRNAs con dos patrones de expresión: aquellos con una expresión diferencial significativa entre las diferentes etapas de la diferenciación de las células troncales y por lo tanto más propensos a tener

un papel en la diferenciación pancreática temprana y aquellos que son expresados diferencialmente entre las células productoras de insulina obtenidas a partir de células troncales obtenidas al final del proceso y las muestras de islotes pancreáticos adultos, considerados candidatos a factores de maduración de las células beta pancreáticas. Esto nos llevó a comparar el perfil de expresión de miRNAs de las células productoras de insulina obtenidas y de los islotes pancreáticos humanos adultos que albergan células beta pancreáticas totalmente maduras y funcionales, lo que nos indica la similitud entre ambos proporcionándonos una idea del nivel de maduración de las células obtenidas. La identificación de los miRNAs altamente expresados en las células de las etapas diferenciadas finales, pero ausente en las células de los islotes pancreáticos adultos y viceversa, sugiere que las CTEs diferenciadas pueden constituir una etapa anterior de las células maduras presentes en los islotes pancreáticos adultos. Por tanto, el perfil de expresión de miRNAs es susceptible de ser afinado para estimular la conducción de las células precursoras a la madurez de los islotes pancreáticos y consideramos razonable que el conjunto de miRNAs que fueron altamente expresados en la etapa tardía de las CTEs diferenciadas, así como los miRNAs enriquecidos en las muestras de islotes pancreáticos adultos son funcionalmente importante en la diferenciación de células beta pancreáticas de los islotes pancreáticos. En apoyo a esta observación, ya hemos visto como varios de estos miRNAs han sido implicados en procesos biológicos de relevancia potencial para el desarrollo de las células del páncreas endocrino incluyendo miR-7, -29a/b, -148a, -199a/b, -375 y las familias let-7, miR-30 y -200. Estudios previos revelaron que los *clusters* pancreáticos similares a los de las células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs mostraban una alta expresión de miRNAs tales como miR-186, -199a y -339, los cuales regulan la expresión de *LIN28*, *PRDM1*, *CALB1*, *GCNT2*, *RBM47*, *PLEKHH1*, *RBPM5* y *PAK6* (Chen et al., 2011). Otro estudio reportó que miR-34a fue expresado durante la diferenciación de progenitores pancreáticos a partir de células endodérmicas y que miR-7, -148a y -375 fueron específicamente expresados durante la diferenciación de progenitores pancreáticos a células productoras de insulina

(Wei et al., 2013). Interesantemente, nuestro estudio reveló alto nivel de expresión de muchos de estos miRNAs tanto en los islotes pancreáticos adultos como en las células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs, excepto miR-7 y -375 que presentaron una expresión disminuida en las últimas etapas de maduración, siendo más atenuada en el caso de miR-7.

Recientemente, se ha demostrado que la sobreexpresión de unos pocos miRNAs puede reprogramar directamente fibroblastos en iPSCs (Liao et al., 2011) o ayudar a otros factores de transcripción para reprogramar fibroblastos directamente en neuronas funcionales (Ambasudhan et al., 2011) o cardiomiocitos (Muraoka et al., 2014), lo que indica que los miRNAs son potentes reguladores de la especificación del linaje celular y pueden constituir herramientas útiles en la diferenciación y maduración de las CTEs. Hemos detallado ampliamente la posibilidad de obtener resultados positivos con protocolos de diferenciación *in vitro* que simulan el mecanismo de desarrollo del páncreas *in vivo* para guiar la diferenciación de las CTEs a células productoras de insulina. Sin embargo, las etapas de maduración son susceptibles de mejoras y además las proteínas recombinantes y factores de crecimiento necesarios para el proceso de diferenciación son extremadamente caros. Esto ha suscitado un gran interés por la investigación de los miRNAs como una herramienta molecular útil en la diferenciación celular que podrían sustituir a estas proteínas en los protocolos, al tiempo que proporcionan un proceso más fácilmente inducible hacia la diferenciación.

El cambio del nivel de expresión de miRNAs durante la diferenciación puede ser una estrategia alternativa para promover la diferenciación y maduración de las células troncales hacia células productoras de insulina. En este sentido han sido descritos varios estudios que indican que la sobreexpresión de miR-375 favorece la diferenciación de las iPSCs humanas hacia el linaje pancreático endocrino en ausencia de factores de crecimiento, induciendo la formación de pequeñas estructuras en las etapas finales de diferenciación que simulan la maduración de los *cluster* de los islotes pancreáticos

(Lahmy et al., 2014). Otro estudio reveló que la sobreexpresión de miR-375 produce la atenuación de *HNF1b* y *SOX9* ilustrando como miR-375 podría regular la diferenciación de las CTEs hacia células pancreáticas (Wei et al., 2013). La sobreexpresión de miR-375 conduce a una reducción en los niveles de la proteína MTPN en células productoras de insulina, mientras que el tratamiento combinado con un inhibidor de miR-9 aumenta la proteína OC-2, proporcionando un efecto sinérgico que contribuye a la diferenciación y mejora la secreción de insulina regulada por glucosa (Jafarian et al., 2015). La expresión de *MAFA* es activada por miR-30d y consecuentemente promueve la producción de insulina en las células beta pancreáticas y su sobreexpresión protege a las células de la supresión del factor de necrosis tumoral α (TNF α) tanto para la secreción de insulina como la transcripción de la insulina a través de la atenuación de MAP4K4, lo que demuestra una nueva función reguladora en las células beta pancreáticas (Zhao et al., 2012). En los islotes pancreáticos humanos y células MIN6 se ha visto como las citoquinas pro-inflamatorias inducen la expresión de miR-21 a través de la activación de NF κ B (Roggli et al., 2010; Zhou et al., 2009), de forma que se ha asociado su sobreexpresión con un incremento en la proliferación de células beta pancreáticas y en combinación con una inhibición de miR-34a protegen a las células de la apoptosis (Backe et al., 2014). Este miR-34a a su vez se ha relacionado con SIRT1 implicado en la homeostasis de glucosa (Rodgers et al., 2005) y la secreción de insulina en células beta pancreáticas (Moynihan et al., 2005), de modo que la inhibición de miR-34a puede no solo reducir la apoptosis sino también mejorar la secreción de insulina a través de la regulación de SIRT1 (Backe et al., 2014). Todos estos resultados ponen en evidencia la posibilidad de regular el desarrollo y la fisiología de células beta pancreáticas controlando el nivel de expresión de miRNAs.

En nuestro estudio observamos como las CTEs inducidas a diferenciarse mediante el protocolo CABIMER adquieren el perfil de expresión de miRNAs más similar respecto al de las muestras de islotes pancreáticos, lo que sugiere que estas CTEs diferenciadas estaban siguiendo una trayectoria hacia el linaje de las células beta pancreáticas de los

islotos pancreáticos, pero aun en un estado inmaduro funcional debido a la baja expresión de algunos miRNAs claves en la funcionalidad de las células beta pancreáticas adultas como miR-7 y -375.

Por lo que, este estudio generamos células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs e investigamos la sobreexpresión de estos miRNAs sobre la diferenciación y maduración de estas células en combinación con factores de crecimiento, mediante un enfoque no invasivo con polímeros catiónicos para la administración de material genético sin una integración permanente o transitoria de factores transformantes como son los sistemas con partículas virales, para evitar riesgos inherentes de posibles aberraciones y mutaciones en el genoma huésped. Nuestros resultados demostraron que las CTEs fueron eficientemente diferenciadas hacia el linaje pancreático. La expresión temprana de miR-7 y -375 resultó clave para el establecimiento del endodermo definitivo identificados por una marcada expresión de *SOX17* y *FOXA2*, a partir del cual se generaron los progenitores pancreáticos identificados por una alta expresión de marcadores como *PDX1*. En consonancia con diversas publicaciones que sitúan a estos miRNAs claves durante las primeras etapas del desarrollo pancreático fetal humano con una edad gestacional de 8 a 22 semanas, produciéndose un enorme incremento entre las semanas 14 y 18 correspondientes a la inducción de factores esenciales para la especificación del destino celular endocrino como *ISL1* y *PDX1* (Correa-Medina et al., 2009). Estos resultados son además, consistentes con los datos en pez cebra (*Danio rerio*) que restringe la expresión de miR-7 a las células endocrinas (Wienholds et al., 2005). Sin embargo, contrario a lo que se podría esperar después de una alta expresión inicial durante la diferenciación de las CTEs, se produjo una disminución gradual en los niveles de miR-7 y -375, los miRNAs más destacados en el páncreas en el que miR-7 ha sido identificado como el miRNA endocrino más abundante en los islotos pancreáticos humanos y murinos adultos (Bravo-Egana et al., 2008), encontrándose en ambas especies unos niveles de expresión superiores al del otro miRNA pancreático destacado como es miR-375 (Joglekar et al., 2009).

Nuestros resultados revelaron que la reexpresión de miR-7 en las etapas de maduración de los progenitores pancreáticos obtenidos a partir de las CTEs humanas, activa la expresión de varios marcadores génicos de islotes pancreáticos como *FOXA2*, *PDX1* e insulina (*INS*) como muestran los resultados de expresión obtenidos mediante qPCR. Datos consistentes con la detección proteica de INSULINA y PÉPTIDO-C en las células diferenciadas. El contenido de insulina de islotes pancreáticos humanos varia ampliamente, aunque se han estimado un valor medio de aproximadamente 22,9 ng/islote lo que representa 11,45 $\mu\text{g}/10^6$ células, asumiendo que los islotes pancreáticos humanos contienen una media de 2.000 células. Nuestro estudio demostró que el contenido de insulina de las células diferenciadas será inferior al nivel esperado, con aproximadamente un 3-7% del contenido de insulina de los islotes pancreáticos humanos sin existir diferencias significativas entre las células con o sin sobreexpresión de miR-7. Sin embargo, los análisis dosis dependiente de la GSIS revelaron que las células con sobreexpresión de miR-7 presentan una respuesta más eficaz, indicativo de una maquinaria pancreática mejorada en estas células y por tanto de un mayor nivel de maduración. Hemos visto, como miR-7 presenta niveles altos de expresión en el páncreas fetal (E14.5-E16.5) y la inhibición embrionaria de miR-7 usando oligos antisentido disminuye el número de células beta, el contenido de insulina y la tolerancia a la glucosa en ratones adultos (Nieto et al., 2012). Además, la manipulación génica de los niveles de miR-7 en ratones demuestra que es importante para la correcta función de las células beta maduras (Latreille et al., 2014). Por lo tanto, parece claro que existe una diferente implicación del miR-7 en función del estadio del desarrollo de las células beta, de modo que mientras este miRNA es importante para la formación de las células beta en el feto, el papel más probable en las células adultas está relacionado con el control de la maquinaria exocítica de secreción de insulina. En un modelo simplista, la GSIS requiere la acción de receptores de superficie celular que responden a la glucosa, una activación resultante de vías de señalización citosólicas y también la inducción de factores de transcripción nucleares que mantienen el fenotipo de células beta maduras.

Así, tras el transporte de glucosa al interior de la célula beta se desencadena el proceso glicolítico que resulta en un aumento de la relación ATP a ADP, cierre de canales de potasio, la despolarización celular, la apertura de los canales de calcio dependiente de voltaje, la liberación de calcio y la inducción de la secreción de insulina (Rorsman y Renström, 2003). Por lo que, el análisis de los componentes de esta maquinaria exocítica, incluyendo la liberación de calcio, podrían tanto a ayudar a explorar el mecanismo preciso de acción del miR-7 durante la diferenciación, como confirmar la mejorada respuesta a estímulos de glucosa de las células obtenidas tal y como sugieren los resultados obtenidos. En tal caso, es plausible pensar que esta modulación transcripcional adicional incorporada a las células productoras de insulina generadas, hace que constituyan un estado más similar, aunque no idéntico, al de las células beta adultas humanas presentando una predisposición mejorada para culminar la maduración *in vivo* mediante el trasplante, una estrategia comúnmente utilizada (Kroon et al., 2008; Rezania et al., 2012) por diversos investigadores.

Por el contrario, otro destacado miRNA analizado en nuestro trabajo como miR-375 con un perfil de expresión muy similar a miR-7 en el desarrollo pancreático no dio lugar a resultados significativos en marcadores génicos o proteicos de islotes pancreáticos ni en la respuesta de las células a estímulos de glucosa. Ambos miRNAs presentaron una expresión similar en las CTEs sometidas al protocolo CABIMER de diferenciación, con un pico de expresión en las primeras etapas para después disminuir gradualmente, si bien es cierto que la disminución de miR-7 fue más acusada dando lugar a niveles de expresión inferiores en las últimas etapas de diferenciación, lo que podría sugerir que miR-375 mantuviera aún niveles adecuados de expresión para llevar a cabo su función en esta etapa de la diferenciación. Aunque miR-7 y -375 son importantes durante varios procesos concretos del desarrollo de las células beta fetales, actualmente se desconoce en qué fases podría estar actuando y el control que ejercen durante el desarrollo, mientras que ha sido más ampliamente estudiado el papel de ambos miRNAs en la célula beta adulta donde parece destacar su implicación en mantener una respuesta

exocítica de insulina apropiada (Poy et al., 2009; Latreille et al., 2014; Salunkhe et al., 2015). No hay duda de que estudios adicionales ayudaran a elucidar aún más la implicación de miR-7 y -375 en las diferentes etapas del proceso de diferenciación de las CTEs para obtener células productoras de insulina.

Por tanto, queda aún mucho por describir con respecto a la función individual y colectiva de todos los miRNAs expresados en las células beta, siendo de particular importancia dado el control que ejercen en el desarrollo y funcionamiento de estas células, así como la asociación entre la alteración de la expresión génica y la diabetes, una enfermedad que representa una importante carga socioeconómica y para la cual los tratamientos actuales disponibles no son totalmente satisfactorios. Actualmente, los miRNAs maduros son pequeñas moléculas que pueden ser fácilmente sintetizados o bien cada una de estas moléculas de ncRNAs pueden ser selectivamente inactivadas mediante moléculas de RNA anti-sentido. Dadas estas propiedades, una vez que la contribución a la regulación de las funciones de células beta pancreáticas sea totalmente establecida, será teóricamente posible favorecer la replicación de células beta pancreáticas, prevenir su muerte o mejorar la síntesis de insulina y su secreción manipulando el nivel de los miRNAs seleccionados. Ya hemos visto como los miRNAs y sus antagonistas presentan una naturaleza similar a la de los RNA de interferencia, por ello las estrategias desarrolladas para silenciar genes mediante los RNA de interferencia han sido fácilmente adaptadas para permitir modificar los niveles celulares de miRNAs. La generación de células productoras de insulina mediante miRNAs específicos en ausencia de factores de crecimiento resulta por el momento una meta lejana de alcanzar. Sin embargo, la mejora en los procesos de maduración para obtener células completamente funcionales mediante la combinación de factores de crecimiento y miRNAs es prometedora, aunque constituye un enfoque que se enfrenta a múltiples desafíos. Uno de los principales será determinar la combinación específica de miRNAs y los tiempos de expresión adecuados a lo largo del proceso de diferenciación para obtener células diferenciadas que produzcan y secreten insulina de manera similar a las

células beta pancreáticas humanas adultas, para una terapia de reemplazo celular en el tratamiento de la diabetes. Más avances en la comprensión de los miRNAs claves en la diferenciación beta pancreática y su uso para estrategias basadas en miRNAs puede aumentar la formación de células productoras de insulina con una mejorada respuesta a los estímulos de glucosa.

Los próximos años revelaran el potencial real de los miRNAs como nuevas herramientas para la prevención y tratamiento de la diabetes u otras enfermedades, revolucionando muchos de los actuales modelos en ciencias biomédicas.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de los resultados de este estudio son las siguientes:

1. Los miRNAs constituyen importantes reguladores a nivel post-transcripcional de la expresión génica durante el desarrollo.
2. Existen pequeños ncRNAs específicos del tipo celular fundamentales para el control del desarrollo, que en las CTEs se encargan tanto del mantenimiento de un estado no diferenciado, como la salida del mismo iniciando los procesos que dan lugar a la diferenciación celular hacia los diferentes tipos de linajes.
3. Los diferentes organismos albergan un conjunto de miRNAs específicos de tejido y en este trabajo identificamos los miRNAs miR-7, -15a, -16, -26a, -29a/b/c, -30d, -124, -148a, -200a/c, -214, -375 y -376a como miRNAs diferencialmente expresados en el páncreas.
4. Los islotes pancreáticos expresan preferencialmente un grupo de miRNAs que se pueden asociar a su desarrollo y funcionalidad e incluye a los miRNAs miR-7, -148a y -375.
5. La combinación de los factores de crecimiento y miRNAs específicos (miR-7) en las etapas de diferenciación de las CTEs, proporciona señales de regulación post-transcripcional importantes para la inducción del linaje pancreático, mejorando la inducción de células productoras de insulina obtenidas a partir de las CTEs.
6. El perfil de expresión de miRNAs durante la inducción de la diferenciación pancreática es común en las diferentes líneas de células pluripotentes humanas estudiadas (HS181 y MSUH-001) y a su vez muy similar al existente durante el desarrollo pancreático.
7. Identificamos grupos de miRNAs que actúan en etapas clave del proceso de diferenciación, que incluye el establecimiento del endodermo definitivo (miR-7, -

373 y -375), la inducción de los progenitores pancreáticos (miR-15a/b y -16) y la maduración de células productoras de insulina (miR-29b y -148a).

8. El subconjunto miR-7, -148a y -375 presenta un gran número de dianas identificadas en la ruta de señalización de la insulina.
9. Se ha identificado a miR-7 como un miRNA destacado en el proceso de maduración de las células productoras de insulina y su sobreexpresión está asociada con un aumento de la expresión en factores de transcripción (*FOXA2*, *NEUROD1*, *PDX1* o *INS*) que desempeñan un papel esencial en el desarrollo pancreático, además de mejorar la funcionalidad de las células.
10. Los resultados en su conjunto constituyen una nueva herramienta para mejorar los procesos y protocolos de obtención de células productoras de insulina a partir de células troncales embrionarias humanas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agulnick, A.D., D.M. Ambruzs, M.A. Moorman, A. Bhoumik, R.M. Cesario, J.K. Payne, J.R. Kelly, C. Haakmeester, R. Srijemac, A.Z. Wilson, J. Kerr, M.A. Frazier, E.J. Kroon, y K.A. D'Amour. 2015. Insulin-Producing Endocrine Cells Differentiated In Vitro From Human Embryonic Stem Cells Function in Macroencapsulation Devices In Vivo. *Stem Cells Transl. Med.* 4:1214-22.
- Ahlqvist, E., F. Turrini, S.T. Lang, J. Taneera, Y. Zhou, P. Almgren, O. Hansson, B. Isomaa, T. Tuomi, K. Eriksson, J.G. Eriksson, V. Lyssenko, y L. Groop. 2012. A common variant upstream of the PAX6 gene influences islet function in man. *Diabetologia.* 55:94-104.
- Ambasudhan, R., M. Talantova, R. Coleman, X. Yuan, S. Zhu, S.A. Lipton, y S. Ding. 2011. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell.* 9:113-8.
- Ambrosetti, D.-C., H.R. Scholer, L. Dailey, y C. Basilico. 2000. Modulation of the Activity of Multiple Transcriptional Activation Domains by the DNA Binding Domains Mediates the Synergistic Action of Sox2 and Oct-3 on the Fibroblast Growth Factor-4Enhancer. *J. Biol. Chem.* 275:23387-97.
- Ambrosetti, D.C., C. Basilico, y L. Dailey. 1997. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 17:6321-9.
- Ameres, S.L., y P.D. Zamore. 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14:475-88.
- Ameri, J., A. Ståhlberg, J. Pedersen, J.K. Johansson, M.M. Johannesson, I. Artner, y H. Semb. 2010. FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner. *Stem Cells.* 28:45-56.
- American Diabetes Association. 2015. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 38 Suppl:S8-S16.
- Andersson, D.K., y K. Svärdsudd. 1995. Long-term glycemic control relates to mortality in type II diabetes. *Diabetes Care.* 18:1534-43.
- Anokye-Danso, F., C.M. Trivedi, D. Juhr, M. Gupta, Z. Cui, Y. Tian, Y. Zhang, W. Yang, P.J. Gruber, J. a. Epstein, y E.E. Morrissey. 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell.* 8:376-88.
- Asfari, M., D. Janjic, P. Meda, G. Li, P.A. Halban, y C.B. Wollheim. 1992. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology.* 130:167-78.
- Assady, S., G. Maor, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, K.L. Skorecki, y M. Tzukerman. 2001. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes.* 50:1691-7.
- Atkinson, M.A., y N.K. Maclaren. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 331:1428-36.
- Avnit-Sagi, T., L. Kantorovich, S. Kredo-Russo, E. Hornstein, y M.D. Walker. 2009. The promoter of the pri-miR-375 gene directs expression selectively to the endocrine pancreas. *PLoS One.* 4:e5033.
- Backe, M.B., G.W. Novotny, D.P. Christensen, L.G. Grunnet, y T. Mandrup-Poulsen. 2014. Altering β -cell number through stable alteration of miR-21 and miR-34a expression. *Islets.* 6:e27754.
- Baek, D., J. Villén, C. Shin, F.D. Camargo, S.P. Gygi, y D.P. Bartel. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature.* 455:64-71.
- Bagga, S., J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus, y A.E. Pasquinelli. 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation. *Cell.* 122:553-63.
- Bagge, A., T.R. Clausen, S. Larsen, M. Ladefoged, M.W. Rosenstjerne, L. Larsen, O. Vang, J.H. Nielsen, y L.T. Dalgaard. 2012. MicroRNA-29a is up-regulated in beta-cells by glucose and decreases glucose-stimulated insulin

- secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426:266-72.
- Bagge, A., C.M. Dahmcke, y L.T. Dalgaard. 2013. Syntaxin-1a is a direct target of miR-29a in insulin-producing β -cells. *Horm. Metab. Res. = Horm. und Stoffwechselforsch. = Horm. métabolisme.* 45:463-6.
- Bai, C., X. Li, Y. Gao, K. Wang, Y. Fan, S. Zhang, Y. Ma, y W. Guan. 2015. Role of microRNA-21 in the formation of insulin-producing cells from pancreatic progenitor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859:280-93.
- Banerji, M.A., R.L. Chaiken, H. Huey, T. Tuomi, A.J. Norin, I.R. Mackay, M.J. Rowley, P.Z. Zimmet, y H.E. Lebovitz. 1994. GAD antibody negative NIDDM in adult black subjects with diabetic ketoacidosis and increased frequency of human leukocyte antigen DR3 and DR4. Flatbush diabetes. *Diabetes.* 43:741-5.
- Banerji, M.A., y H.E. Lebovitz. 1989. Insulin-sensitive and insulin-resistant variants in NIDDM. *Diabetes.* 38:784-92.
- Baran-Gale, J., E.E. Fannin, C.L. Kurtz, y P. Sethupathy. 2013. Beta cell 5'-shifted isomiRs are candidate regulatory hubs in type 2 diabetes. *PLoS One.* 8:e73240.
- Barnett, A.H., C. Eff, R.D. Leslie, y D.A. Pyke. 1981. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia.* 20:87-93.
- Baroukh, N., M. a. Ravier, M.K. Loder, E. V. Hill, A. Bounacer, R. Scharfmann, G. a. Rutter, y E. Van Obberghen. 2007. MicroRNA-124a regulates foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic β -cell lines. *J. Biol. Chem.* 282:19575-88.
- Baroukh, N.N., y E. Van Obberghen. 2009. Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain. *FEBS J.* 276:6509-21.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 116:281-97.
- Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 136:215-33.
- Barton, F.B., M.R. Rickels, R. Alejandro, B.J. Hering, S. Wease, B. Naziruddin, J. Oberholzer, J.S. Odorico, M.R. Garfinkel, M. Levy, F. Pattou, T. Berney, A. Secchi, S. Messinger, P.A. Senior, P. Maffi, A. Posselt, P.G. Stock, D.B. Kaufman, X. Luo, F. Kandeel, E. Cagliero, N.A. Turgeon, P. Witkowski, A. Naji, P.J. O'Connell, C. Greenbaum, Y.C. Kudva, K.L. Brayman, M.J. Aull, C. Larsen, T.W.H. Kay, L.A. Fernandez, M.-C. Vantyghem, M. Bellin, y A.M.J. Shapiro. 2012. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care.* 35:1436-45.
- Belgardt, B.-F., K. Ahmed, M. Spranger, M. Latreille, R. Denzler, N. Kondratiuk, F. von Meyenn, F.N. Villena, K. Herrmanns, D. Bosco, J. Kerr-Conte, F. Pattou, T. Rüdicker, y M. Stoffel. 2015. The microRNA-200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nat. Med.* 21:619-27.
- Beres, T.M., T. Masui, G.H. Swift, L. Shi, R.M. Henke, y R.J. MacDonald. 2006. PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Mol. Cell. Biol.* 26:117-30.
- Berná, G., T. León-Quinto, R. Enseñat-Waser, E. Montanya, F. Martín, y B. Soria. 2001. Stem cells and diabetes. *Biomed. Pharmacother. = Biomédecine pharmacothérapie.* 55:206-12.
- Bernstein, B.E., A. Meissner, y E.S. Lander. 2007. The mammalian epigenome. *Cell.* 128:669-81.
- Bernstein, E., S.Y. Kim, M.A. Carmell, E.P. Murchison, H. Alcorn, M.Z. Li, A.A. Mills, S.J. Elledge, K. V Anderson, y G.J. Hannon. 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35:215-7.
- Biswas, A., y R. Hutchins. 2007. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 16:213-22.
- Bogardus, C., S. Lillioja, D.M. Mott, C. Hollenbeck, y G. Reaven. 1985. Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. *Am. J. Physiol.* 248:E286-91.

- Bolmeson, C., J.L.S. Esguerra, A. Salehi, D. Speidel, L. Eliasson, y C.M. Cilio. 2011. Differences in islet-enriched miRNAs in healthy and glucose intolerant human subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404:16-22.
- Bonasio, R., y R. Shiekhattar. 2014. Regulation of transcription by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Genet.* 48:433-55.
- Borchert, G.M., W. Lanier, y B.L. Davidson. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:1097-101.
- Bort, R., J.P. Martinez-Barbera, R.S.P. Beddington, y K.S. Zaret. 2004. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development.* 131:797-806.
- Botquin, V., H. Hess, G. Fuhrmann, C. Anastassiadis, M.K. Gross, G. Vriend, y H.R. Schöler. 1998. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* 12:2073-90.
- Boyer, L.A., T.I. Lee, M.F. Cole, S.E. Johnstone, S.S. Levine, J.P. Zucker, M.G. Guenther, R.M. Kumar, H.L. Murray, R.G. Jenner, D.K. Gifford, D.A. Melton, R. Jaenisch, y R.A. Young. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 122:947-56.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Bravo-Egana, V., S. Rosero, R.D. Molano, A. Pileggi, C. Ricordi, J. Domínguez-Bendala, y R.L. Pastori. 2008. Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366:922-26.
- Brennecke, J., A.A. Aravin, A. Stark, M. Dus, M. Kellis, R. Sachidanandam, y G.J. Hannon. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* 128:1089-103.
- Bruin, J.E., S. Erener, J. Vela, X. Hu, J.D. Johnson, H.T. Kurata, F.C. Lynn, J.M. Piret, A. Asadi, A. Rezaia, y T.J. Kieffer. 2014. Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived in vitro from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 12:194-208.
- Bruin, J.E., A. Rezaia, J. Xu, K. Narayan, J.K. Fox, J.J. O'Neil, y T.J. Kieffer. 2013. Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice. *Diabetologia.* 56.
- Bruin, J.E., N. Saber, S. O'Dwyer, J.K. Fox, M. Mojibian, P. Arora, A. Rezaia, y T.J. Kieffer. 2016. Hypothyroidism Impairs Human Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitor Cell Maturation in Mice. *Diabetes.* 65:1297-309.
- van de Bunt, M., K.J. Gaulton, L. Parts, I. Moran, P.R. Johnson, C.M. Lindgren, J. Ferrer, A.L. Gloyn, y M.I. McCarthy. 2013. The miRNA profile of human pancreatic islets and beta-cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis. *PLoS One.* 8:e55272.
- Burdon, T., A. Smith, y P. Savatier. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 12:432-8.
- Burtscher, I., y H. Lickert. 2009. Foxa2 regulates polarity and epithelialization in the endoderm germ layer of the mouse embryo. *Development.* 136:1029-38.
- Butkiewicz, E.K., C.L. Leibson, P.C. O'Brien, P.J. Palumbo, y R.A. Rizza. 1995. Insulin therapy for diabetic ketoacidosis. Bolus insulin injection versus continuous insulin infusion. *Diabetes Care.* 18:1187-90.
- Cai, J., C. Yu, Y. Liu, S. Chen, Y. Guo, J. Yong, W. Lu, M. Ding, y H. Deng. 2010. Generation of homogeneous PDX1+ pancreatic progenitors from human ES cell-derived endoderm cells. *J. Mol. Cell Biol.* 2:50-60.
- Cai, X., C.H. Hagedorn, y B.R. Cullen. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated

- transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 10:1957-66.
- Calvanese, V., E. Lara, B. Suárez-Alvarez, R. Abu Dawud, M. Vázquez-Chantada, M.L. Martínez-Chantar, N. Embade, P. López-Nieva, A. Horrillo, A. Hmadcha, B. Soria, D. Piazzolla, D. Herranz, M. Serrano, J.M. Mato, P.W. Andrews, C. López-Larrea, M. Esteller, y M.F. Fraga. 2010. Sirtuin 1 regulation of developmental genes during differentiation of stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:13736-41.
- Campos, E.I., y D. Reinberg. 2009. Histones: annotating chromatin. *Annu. Rev. Genet.* 43:559-99.
- Cano, D.A., B. Soria, F. Martín, y A. Rojas. 2014. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 71:2383-402.
- Cardoso, W. V, y J. Lü. 2006. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development*. 133:1611-24.
- Carrasco, M., I. Delgado, B. Soria, F. Martín, y A. Rojas. 2012. GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J. Clin. Invest.* 122:3504-15.
- Carthew, R.W., y E.J. Sontheimer. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136:642-55.
- Cartwright, P., C. McLean, A. Sheppard, D. Rivett, K. Jones, y S. Dalton. 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 132:885-96.
- Cell, C.S., K.N. Ivey, A. Muth, J. Arnold, F.W. King, R.-F. Yeh, J.E. Fish, C. Edward, R.J. Schwartz, B.R. Conklin, H.S. Bernstein, D. Srivastava, E.C. Hsiao, R.J. Schwartz, B.R. Conklin, H.S. Bernstein, y D. Srivastava. 2008. Supplemental Data MicroRNA Regulation of Cell Lineages in Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2:219-29.
- Cersosimo, E., P.W. Pisters, G. Pesola, K. McDermott, D. Bajorunas, y M.F. Brennan. 1991. Insulin secretion and action in patients with pancreatic cancer. *Cancer*. 67:486-93.
- Chakraborty, C., C.G.P. Doss, S. Bandyopadhyay, y G. Agoramoorthy. 2014. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: Micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 5:697-712.
- Chang, T.-C., y J.T. Mendell. 2007. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8:215-39.
- Chao, K.C., K.F. Chao, Y.S. Fu, y S.H. Liu. 2008. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One*. 3:e1451.
- Chase, L.G., y M.T. Firpo. 2007. Development of serum-free culture systems for human embryonic stem cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11:367-72.
- Chen, B.-Z., S.-L. Yu, S. Singh, L.-P. Kao, Z.-Y. Tsai, P.-C. Yang, B.-H. Chen, y S. Shoei-Lung Li. 2011. Identification of microRNAs expressed highly in pancreatic islet-like cell clusters differentiated from human embryonic stem cells. *Cell Biol. Int.* 35:29-37.
- Chen, S., M. Borowiak, J.L. Fox, R. Maehr, K. Osafune, L. Davidow, K. Lam, L.F. Peng, S.L. Schreiber, L.L. Rubin, y D. Melton. 2009. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat. Chem. Biol.* 5:258-65.
- Chen, X., P.J. Rozance, W.W. Hay, y S.W. Limesand. 2012. Insulin-like growth factor and fibroblast growth factor expression profiles in growth-restricted fetal sheep pancreas. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 237:524-9.
- Chen, Y.-G., Q. Wang, S.-L. Lin, C.D. Chang, J. Chuang, J. Chung, y S.-Y. Ying. 2006. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 231:534-44.

-
- Chew, J.-L., Y.-H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W.-L. Tam, L.-S. Yeap, P. Li, Y.-S. Ang, B. Lim, P. Robson, y H.-H. Ng. 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 25:6031-46.
- Chomczynski, P., y N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9.
- Conley, B.J., S. Ellis, L. Gulluyan, y R. Mollard. 2007. BMPs regulate differentiation of a putative visceral endoderm layer within human embryonic stem-cell-derived embryoid bodies. *Biochem. Cell Biol.* 85:121-32.
- Correa-Medina, M., V. Bravo-Egana, S. Rosero, C. Ricordi, H. Edlund, J. Diez, y R.L. Pastori. 2009. MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. *Gene Expr. Patterns.* 9:193-99.
- Couri, C.E.B., y J.C. Voltarelli. 2008. Autologous stem cell transplantation for early type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity.* 41:666-72.
- Czech, B., R. Zhou, Y. Erlich, J. Brennecke, R. Binari, C. Villalta, A. Gordon, N. Perrimon, y G.J. Hannon. 2009. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol. Cell.* 36:445-56.
- D'Amour, K.A., A.D. Agulnick, S. Eliazar, O.G. Kelly, E. Kroon, y E.E. Baetge. 2005. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* 23:1534-41.
- D'Amour, K. a, A.G. Bang, S. Eliazar, O.G. Kelly, A.D. Agulnick, N.G. Smart, M. a Moorman, E. Kroon, M.K. Carpenter, y E.E. Baetge. 2006. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 24:1392-401.
- Dai, C., M. Brissova, Y. Hang, C. Thompson, G. Poffenberger, A. Shostak, Z. Chen, R. Stein, y A.C. Powers. 2012. Islet-enriched gene expression and glucose-induced insulin secretion in human and mouse islets. *Diabetologia.* 55:707-18.
- Dambrot, C., R. Passier, D. Atsma, y C.L.L. Mummery. 2011. Cardiomyocyte differentiation of pluripotent stem cells and their use as cardiac disease models. *Biochem. J.* 434:25-35.
- Dang, C. V, K.A. O'Donnell, K.I. Zeller, T. Nguyen, R.C. Osthus, y F. Li. 2006. The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16:253-64.
- Darr, H., y N. Benvenisty. 2006. Human embryonic stem cells: the battle between self-renewal and differentiation. *Regen. Med.* 1:317-25.
- Davidson, K.C., A.M. Adams, J.M. Goodson, C.E. McDonald, J.C. Potter, J.D. Berndt, T.L. Biechele, R.J. Taylor, y R.T. Moon. 2012. Wnt/ β -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:4485-90.
- Davidson, K.C., P. Jamshidi, R. Daly, M.T.W. Hearn, M.F. Pera, y M. Dottori. 2007. Wnt3a regulates survival, expansion, and maintenance of neural progenitors derived from human embryonic stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 36:408-15.
- DeFronzo, R., D. Deibert, R. Hendler, P. Felig, y V. Soman. 1979. Insulin sensitivity and insulin binding to monocytes in maturity-onset diabetes. *J. Clin. Invest.* 63:939-46.
- Delaspre, F., M. Massumi, M. Salido, B. Soria, P. Ravassard, P. Savatier, y A. Skoudy. 2013. Directed pancreatic acinar differentiation of mouse embryonic stem cells via embryonic signalling molecules and exocrine transcription factors. *PLoS One.* 8:e54243.
- Denli, A.M., B.B.J. Tops, R.H.A. Plasterk, R.F. Ketting, y G.J. Hannon. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 432:231-5.
-

- Deutsch, G., J. Jung, M. Zheng, J. Lórá, y K.S. Zaret. 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*. 128:871-81.
- Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Seignani, E. Wentzel, E.E. Furth, W.M. Lee, G.H. Enders, J.T. Mendell, y A. Thomas-Tikhonenko. 2006. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat. Genet.* 38:1060-5.
- Doench, J.G., y P.A. Sharp. 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18:504-11.
- Doetschman, T.C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, y R. Kemler. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87:27-45.
- Du, A., C.S. Hunter, J. Murray, D. Noble, C.-L. Cai, S.M. Evans, R. Stein, y C.L. May. 2009. Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. *Diabetes*. 58:2059-69.
- Duester, G. 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell*. 134:921-31.
- Dufort, D., L. Schwartz, K. Harpal, y J. Rossant. 1998. The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis. *Development*. 125:3015-25.
- Efroni, S., R. Duttagupta, J. Cheng, H. Dehghani, D.J. Hoepfner, C. Dash, D.P. Bazett-Jones, S. Le Grice, R.D.G. McKay, K.H. Buetow, T.R. Gingeras, T. Misteli, y E. Meshorer. 2008. Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2:437-47.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 26 Suppl 1:S5-20.
- Fernandez-Valverde, S.L., R.J. Taft, y J.S. Mattick. 2011. MicroRNAs in ??-cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. *Diabetes*. 60:1825-31.
- Filios, S.R., G. Xu, J. Chen, K. Hong, G. Jing, y A. Shalev. 2014. MicroRNA-200 is induced by thioredoxin-interacting protein and regulates Zeb1 protein signaling and beta cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 289:36275-83.
- Firth, R.G., P.M. Bell, y R.A. Rizza. 1986. Effects of tolazamide and exogenous insulin on insulin action in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 314:1280-6.
- Fluckiger, A.-C., G. Marcy, M. Marchand, D. N gre, F.-L. Cosset, S. Mitalipov, D. Wolf, P. Savatier, y C. Dehay. 2006. Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells*. 24:547-56.
- Forrest, J.M., M.A. Menser, y J.A. Burgess. 1971. High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. *Lancet (London, England)*. 2:332-4.
- Frandsen, U., A.D. Porneki, C. Floridon, B.M. Abdallah, y M. Kassem. 2007. Activin B mediated induction of Pdx1 in human embryonic stem cell derived embryoid bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362:568-74.
- Fraser, P., y W. Bickmore. 2007. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature*. 447:413-7.
- Fu, X., L. Jin, X. Wang, A. Luo, J. Hu, X. Zheng, W.M. Tsark, A.D. Riggs, H.T. Ku, y W. Huang. 2013. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:17892-7.
- Fujimoto, W.Y., D.L. Leonetti, J.L. Kinyoun, W.P. Shuman, W.C. Stolov, y P.W. Wahl. 1987. Prevalence of complications among second-generation Japanese-American men with diabetes, impaired glucose tolerance, or normal glucose tolerance. *Diabetes*. 36:730-9.

- Fujitani, Y., S. Fujitani, D.F. Boyer, M. Gannon, Y. Kawaguchi, M. Ray, M. Shiota, R.W. Stein, M.A. Magnuson, y C.V.E. Wright. 2006. Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation. *Genes Dev.* 20:253-66.
- Fukuda, T., K. Yamagata, S. Fujiyama, T. Matsumoto, I. Koshida, K. Yoshimura, M. Mihara, M. Naitou, H. Endoh, T. Nakamura, C. Akimoto, Y. Yamamoto, T. Katagiri, C. Foulds, S. Takezawa, H. Kitagawa, K. Takeyama, B.W. O'Malley, y S. Kato. 2007. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 9:604-11.
- Furukawa, M., Y. Eto, y I. Kojima. 1995. Expression of immunoreactive activin A in fetal rat pancreas. *Endocr. J.* 42:63-8.
- Gadue, P., T.L. Huber, M.C. Nostro, S. Kattman, y G.M. Keller. 2005. Germ layer induction from embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* 33:955-64.
- Gangaraju, V.K., y H. Lin. 2009. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:116-25.
- Gao, N., J. LeLay, M.Z. Vatamaniuk, S. Rieck, J.R. Friedman, y K.H. Kaestner. 2008. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev.* 22:3435-48.
- Garzon, R., G.A. Calin, y C.M. Croce. 2009. MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Med.* 60:167-179.
- Gauthier, B.R., Y. Gosmain, A. Mamin, y J. Philippe. 2007. The beta-cell specific transcription factor Nkx6.1 inhibits glucagon gene transcription by interfering with Pax6. *Biochem. J.* 403:593-601.
- Gifford, C.A., M.J. Ziller, H. Gu, C. Trapnell, J. Donaghey, A. Tsankov, A.K. Shalek, D.R. Kelley, A.A. Shishkin, R. Issner, X. Zhang, M. Coyne, J.L. Fostel, L. Holmes, J. Meldrim, M. Guttman, C. Epstein, H. Park, O. Kohlbacher, J. Rinn, A. Gnirke, E.S. Lander, B.E. Bernstein, y A. Meissner. 2013. Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell.* 153:1149-63.
- Gradwohl, G., A. Dierich, M. LeMeur, y F. Guillemot. 2000. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:1607-11.
- Grapin-Botton, A., A.R. Majithia, y D.A. Melton. 2001. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev.* 15:444-54.
- Grishok, A., A.E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D.L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun, y C.C. Mello. 2001. Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control C. elegans Developmental Timing. *Cell.* 106:23-34.
- Gruber, A.J., W.A. Grandy, P.J. Balwiercz, Y.A. Dimitrova, M. Pachkov, C. Ciaudo, E. van Nimwegen, y M. Zavolan. 2014. Embryonic stem cell-specific microRNAs contribute to pluripotency by inhibiting regulators of multiple differentiation pathways. *Nucleic Acids Res.* 42:9313-26.
- Gu, C., G.H. Stein, N. Pan, S. Goebbels, H. Hörnberg, K.-A. Nave, P. Herrera, P. White, K.H. Kaestner, L. Sussel, y J.E. Lee. 2010. Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab.* 11:298-310.
- Gu, G., J. Dubauskaite, y D.A. Melton. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development.* 129:2447-57.
- Guay, C., E. Roggli, V. Nesca, C. Jacovetti, y R. Regazzi. 2011. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl. Res.* 157:253-64.
- Guo, S., X. Mao, F. He, H. Liu, y L. Ming. 2014. Activin A supplement in the hESCs culture enhances the endoderm differentiation efficiency. *Cell Biol. Int.* 38:849-56.
- Gurung, B., A.B. Muhammad, y X. Hua. 2014. Menin is required for optimal processing of the microRNA let-7a. *J.*

- Biol. Chem.* 289:9902-8.
- Hadjimichael, C., C. Nikolaou, J. Papamatheakis, y A. Kretsovali. 2016. MicroRNAs for Fine-Tuning of Mouse Embryonic Stem Cell Fate Decision through Regulation of TGF- β Signaling. *Stem cell reports*. 6:292-301.
- Hagan, J.P., E. Piskounova, y R.I. Gregory. 2009. Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:1021-5.
- Haller, M.J., C.H. Wasserfall, K.M. McGrail, M. Cintron, T.M. Brusko, J.R. Wingard, S.S. Kelly, J.J. Shuster, M.A. Atkinson, y D.A. Schatz. 2009. Autologous umbilical cord blood transfusion in very young children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 32:2041-6.
- Hang, Y., y R. Stein. 2011. MafA and MafB activity in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 22:364-73.
- Harris, M.I. Impaired glucose tolerance in the U.S. population. *Diabetes Care*. 12:464-74.
- Hart, A.W., N. Baeza, A. Apelqvist, y H. Edlund. 2000. Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature*. 408:864-8.
- Haumaitre, C., E. Barbacci, M. Jenny, M.O. Ott, G. Gradwohl, y S. Cereghini. 2005. Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:1490-5.
- Hausser, J., P. Berninger, C. Rodak, Y. Jantscher, S. Wirth, y M. Zavolan. 2009. MirZ: an integrated microRNA expression atlas and target prediction resource. *Nucleic Acids Res.* 37:W266-72.
- Hawkins, R.D., G.C. Hon, L.K. Lee, Q. Ngo, R. Lister, M. Pelizzola, L.E. Edsall, S. Kuan, Y. Luu, S. Klugman, J. Antosiewicz-Bourget, Z. Ye, C. Espinoza, S. Agarwahl, L. Shen, V. Ruotti, W. Wang, R. Stewart, J.A. Thomson, J.R. Ecker, y B. Ren. 2010. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell*. 6:479-91.
- Hay, D.C., J. Fletcher, C. Payne, J.D. Terrace, R.C.J. Gallagher, J. Snoeys, J.R. Black, D. Wojtacha, K. Samuel, Z. Hannoun, A. Pryde, C. Filippi, I.S. Currie, S.J. Forbes, J.A. Ross, P.N. Newsome, y J.P. Iredale. 2008. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:12301-6.
- Hayek, A., y G.M. Beattie. 1997. Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:2471-5.
- He, J., J. Zhang, C. Yi, Q. Lv, W. Xie, J. Li, G. Wan, K. Cui, H. Kung, J. Yang, B.B. Yang, y Y. Zhang. 2010. miRNA-mediated functional changes through co-regulating function related genes. *PLoS One*. 5:e13558.
- Hebrok, M., S.K. Kim, y D.A. Melton. 1998. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* 12:1705-13.
- Hebrok, M., S.K. Kim, B. St Jacques, A.P. McMahon, y D.A. Melton. 2000. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development*. 127:4905-13.
- Hennessy, E., M. Clynes, P.B. Jeppesen, y L. O'Driscoll. 2010. Identification of microRNAs with a role in glucose stimulated insulin secretion by expression profiling of MIN6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396:457-62.
- Henry, R.R., P. Wallace, y J.M. Olefsky. 1986. Effects of weight loss on mechanisms of hyperglycemia in obese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 35:990-8.
- Heo, I., C. Joo, J. Cho, M. Ha, J. Han, y V.N. Kim. 2008. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol. Cell*. 32:276-84.
- Heo, I., C. Joo, Y.-K. Kim, M. Ha, M.-J. Yoon, J. Cho, K.-H. Yeom, J. Han, y V.N. Kim. 2009. TUT4 in concert with Lin28

- suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell*. 138:696-708.
- Hinton, A., I. Afrikanova, M. Wilson, C.C. King, B. Maurer, G.W. Yeo, A. Hayek, y A.E. Pasquinelli. 2010. A distinct microRNA signature for definitive endoderm derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 19:797-807.
- Hinton, A., S. Hunter, G. Reyes, G.B. Fogel, y C.C. King. 2012. From Pluripotency to Islets. MiRNAs as Critical Regulators of Human Cellular Differentiation. 79. Elsevier. 1-34 pp.
- Hmadcha, A., H. Abdelkrim, J. Domínguez-Bendala, D.-B. Juan, J. Wakeman, W. Jane, M. Arredouani, A. Mohamed, B. Soria, S. Bernat, H. Abdelkrim, J. Domínguez-Bendala, D.-B. Juan, J. Wakeman, W. Jane, M. Arredouani, A. Mohamed, B. Soria, y S. Bernat. 2009. The immune boundaries for stem cell based therapies: problems and prospective solutions. *J. Cell. Mol. Med*. 13:1464-75.
- Van Hoof, D., K.A. D'Amour, y M.S. German. 2009. Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 3:73-87.
- Hori, Y., I.C. Rulifson, B.C. Tsai, J.J. Heit, J.D. Cahoy, y S.K. Kim. 2002. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 99:16105-10.
- Horrillo, A., D. Pezzolla, M.F. Fraga, Y. Aguilera, C. Salguero-Aranda, J.R. Tejedo, F. Martin, F.J. Bedoya, B. Soria, y A. Hmadcha. 2013. Zebularine regulates early stages of mESC differentiation: effect on cardiac commitment. *Cell Death Dis*. 4:e570.
- Houbaviy, H.B., M.F. Murray, y P.A. Sharp. 2003. Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs. *Dev. Cell*. 5:351-58.
- Hovatta, O., M. Mikkola, K. Gertow, A.-M.M. Strömberg, J. Inzunza, J. Hreinsson, B. Rozell, E. Blennow, M. Andäng, L. Åhrlund-Richter, y L. Åhrlund-Richter. 2003. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum. Reprod*. 18:1404-09.
- Hoveizi, E., M. Massumi, S. Ebrahimi-barough, S. Tavakol, y J. Ai. 2015. Differential effect of Activin A and WNT3a on definitive endoderm differentiation on electrospun nanofibrous PCL scaffold. *Cell Biol. Int*. 39:591-9.
- Hua, Z., Q. Lv, W. Ye, C.-K.A. Wong, G. Cai, D. Gu, Y. Ji, C. Zhao, J. Wang, B.B. Yang, y Y. Zhang. 2006. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One*. 1:e116.
- Huang, W., G. Wang, F. Delaspre, M.D.C. Vitery, R.L. Beer, y M.J. Parsons. 2014. Retinoic acid plays an evolutionarily conserved and biphasic role in pancreas development. *Dev. Biol*. 394:83-93.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl, y P.D. Zamore. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 293:834-8.
- Hutvagner, G., y P.D. Zamore. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 297:2056-60.
- Iguchi, H., Y. Ikeda, M. Okamura, T. Tanaka, Y. Urashima, H. Ohguchi, S. Takayasu, N. Kojima, S. Iwasaki, R. Ohashi, S. Jiang, G. Hasegawa, R.X. Ioka, K. Magoori, K. Sumi, T. Maejima, A. Uchida, M. Naito, T.F. Osborne, M. Yanagisawa, T.T. Yamamoto, T. Kodama, y J. Sakai. 2005. SOX6 attenuates glucose-stimulated insulin secretion by repressing PDX1 transcriptional activity and is down-regulated in hyperinsulinemic obese mice. *J. Biol. Chem*. 280:37669-80.
- Inniss, K., y H. Moore. 2006. Mediation of apoptosis and proliferation of human embryonic stem cells by sphingosine-1-phosphate. *Stem Cells Dev*. 15:789-96.
- Ivanova, N., R. Dobrin, R. Lu, I. Kotenko, J. Levorse, C. DeCoste, X. Schafer, Y. Lun, y I.R. Lemischka. 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 442:533-8.
- Ivey, K.N., y D. Srivastava. 2010. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell*.

- 7:36-41.
- Izzedine, H., V. Launay-Vacher, C. Deybach, E. Bourry, B. Barrou, y G. Deray. 2005. Drug-induced diabetes mellitus. *Expert Opin. Drug Saf.* 4:1097-109.
- Jacquemin, P., F.P. Lemaigre, y G.G. Rousseau. 2003. The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. *Dev. Biol.* 258:105-16.
- Jadresic, A., L.M. Banks, D.F. Child, L. Diamant, F.H. Doyle, T.R. Fraser, y G.F. Joplin. 1982. The acromegaly syndrome. Relation between clinical features, growth hormone values and radiological characteristics of the pituitary tumours. *Q. J. Med.* 51:189-204.
- Jaenisch, R., y R. Young. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 132:567-82.
- Jafarian, A., M. Taghikani, S. Abroun, A. Allahverdi, M. Lamei, N. Lakpour, y M. Soleimani. 2015. The Generation of Insulin Producing Cells from Human Mesenchymal Stem Cells by MiR-375 and Anti-MiR-9. *PLoS One.* 10:e0128650.
- Jennings, R.E., A.A. Berry, R. Kirkwood-Wilson, N.A. Roberts, T. Hearn, R.J. Salisbury, J. Blaylock, K. Piper Hanley, y N.A. Hanley. 2013. Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes.* 62:3514-22.
- Jensen, J., P. Serup, C. Karlsen, T.F. Nielsen, y O.D. Madsen. 1996. mRNA profiling of rat islet tumors reveals nkx 6.1 as a beta-cell-specific homeodomain transcription factor. *J. Biol. Chem.* 271:18749-58.
- Jeon, J., M. Correa-Medina, C. Ricordi, H. Edlund, y J.A. Diez. 2009. Endocrine cell clustering during human pancreas development. *J. Histochem. Cytochem.* 57:811-24.
- Jiang, F.X., D.S. Cram, H.J. DeAizpurua, y L.C. Harrison. 1999. Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 48:722-30.
- Jiang, J., M. Au, K. Lu, A. Eshpeter, G. Korbitt, G. Fisk, y A.S. Majumdar. 2007a. Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 25:1940-53.
- Jiang, J., Y.-S. Chan, Y.-H. Loh, J. Cai, G.-Q. Tong, C.-A. Lim, P. Robson, S. Zhong, y H.-H. Ng. 2008. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10:353-60.
- Jiang, W., Y. Shi, D. Zhao, S. Chen, J. Yong, J. Zhang, T. Qing, X. Sun, P. Zhang, M. Ding, D. Li, y H. Deng. 2007b. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res.* 17:333-44.
- Jin, S., D.C. Martinelli, X. Zheng, M. Tessier-Lavigne, y C.-M. Fan. 2015. Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:E73-80.
- Joglekar, M. V., V.M. Joglekar, y A. a. Hardikar. 2009. Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr. Patterns.* 9:109-13.
- Joglekar, M. V., V.S. Parekh, S. Mehta, R.R. Bhonde, y A. a. Hardikar. 2007. MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3. *Dev. Biol.* 311:603-12.
- Johannesson, M., A. Ståhlberg, J. Ameri, F.W. Sand, K. Norrman, y H. Semb. 2009. FGF4 and retinoic acid direct differentiation of hESCs into PDX1-expressing foregut endoderm in a time- and concentration-dependent manner. *PLoS One.* 4:e4794.
- Johnson, C.D., A. Esquela-Kerscher, G. Stefani, M. Byrom, K. Kelnar, D. Ovcharenko, M. Wilson, X. Wang, J. Shelton, J. Shingara, L. Chin, D. Brown, y F.J. Slack. 2007. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 67:7713-22.

-
- Jopling, C.L., M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, y P. Sarnow. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 309:1577-81.
- Judson, R.L., J.E. Babiarz, M. Venere, y R. Blueloch. 2009. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* 27:459-61.
- Kaikkonen, M.U., M.T.Y. Lam, y C.K. Glass. 2011. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc. Res.* 90:430-40.
- Kalis, M., C. Bolmeson, J.L.S. Esguerra, S. Gupta, A. Edlund, N. Tormo-Badia, D. Speidel, D. Holmberg, S. Mayans, N.K.S. Khoo, A. Wendt, L. Eliasson, y C.M. Cilio. 2011. Beta-cell specific deletion of Dicer1 leads to defective insulin secretion and diabetes mellitus. *PLoS One*. 6:e29166.
- Kamata, M., M. Liang, S. Liu, Y. Nagaoka, y I.S.Y. Chen. 2010. Live cell monitoring of hiPSC generation and differentiation using differential expression of endogenous microRNAs. *PLoS One*. 5:e11834.
- Kanai-Azuma, M., Y. Kanai, J.M. Gad, Y. Tajima, C. Taya, M. Kurohmaru, Y. Sanai, H. Yonekawa, K. Yazaki, P.P.L. Tam, y Y. Hayashi. 2002. Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development*. 129:2367-79.
- Kanellopoulou, C., S.A. Muljo, A.L. Kung, S. Ganesan, R. Drapkin, T. Jenuwein, D.M. Livingston, y K. Rajewsky. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* 19:489-501.
- Kang, M.H., L.-H. Zhang, N. Wijesekara, W. de Haan, S. Butland, A. Bhattacharjee, y M.R. Hayden. 2013. Regulation of ABCA1 protein expression and function in hepatic and pancreatic islet cells by miR-145. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33:2724-32.
- Kanji, M.S., M.G. Martin, y A. Bhushan. 2013. Dicer1 is required to repress neuronal fate during endocrine cell maturation. *Diabetes*. 62:1602-11.
- Kantharidis, P., B. Wang, R.M. Carew, y H.Y. Lan. 2011. Diabetes complications: the microRNA perspective. *Diabetes*. 60:1832-7.
- Karjalainen, J., M. Knip, H. Hyöty, P. Leinikki, J. Ilonen, M.L. Käär, y H.K. Akerblom. 1988. Relationship between serum insulin autoantibodies, islet cell antibodies and Coxsackie-B4 and mumps virus-specific antibodies at the clinical manifestation of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 31:146-52.
- Kawaguchi, Y., B. Cooper, M. Gannon, M. Ray, R.J. MacDonald, y C.V.E. Wright. 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat. Genet.* 32:128-34.
- Kedde, M., y R. Agami. 2008. Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell Cycle*. 7:899-903.
- Keen, H., A. Glynn, J.C. Pickup, G.C. Viberti, R.W. Bilous, R.J. Jarrett, y R. Marsden. 1980. Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycaemic potency in healthy men. *Lancet (London, England)*. 2:398-401.
- Keller, G. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 19:1129-55.
- Kelly, O.G., M.Y. Chan, L.A. Martinson, K. Kadoya, T.M. Ostertag, K.G. Ross, M. Richardson, M.K. Carpenter, K.A. D'Amour, E. Kroon, M. Moorman, E.E. Baetge, y A.G. Bang. 2011. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29:750-6.
- Kelly, W.D., R.C. Lillehei, F.K. Merkel, Y. Idezuki, y F.C. Goetz. 1967. Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*. 61:827-37.
- Kemp, C.B., M.J. Knight, D.W. Scharp, P.E. Lacy, y W.F. Ballinger. 1973. Transplantation of isolated pancreatic islets
-

- into the portal vein of diabetic rats. *Nature*. 244:447.
- Khvorova, A., A. Reynolds, y S.D. Jayasena. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 115:209-16.
- Kim, J.-W., Y.-H. You, S. Jung, H. Suh-Kim, I.-K. Lee, J.-H. Cho, y K.-H. Yoon. 2013. miRNA-30a-5p-mediated silencing of Beta2/NeuroD expression is an important initial event of glucotoxicity-induced beta cell dysfunction in rodent models. *Diabetologia*. 56:847-55.
- Kim, J., J. Chu, X. Shen, J. Wang, y S.H. Orkin. 2008. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*. 132:1049-61.
- Kim, P.T.W., B.G. Hoffman, A. Plesner, C.D. Helgason, C. Bruce Verchere, S.W. Chung, G.L. Warnock, A.L.F. Mui, y C.J. Ong. 2010. Differentiation of mouse embryonic stem cells into endoderm without embryoid body formation. *PLoS One*. 5.
- Kim, S.K., M. Hebrok, E. Li, S.P. Oh, H. Schrewe, E.B. Harmon, J.S. Lee, y D.A. Melton. 2000. Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev*. 14:1866-71.
- Kim, S.K., M. Hebrok, y D.A. Melton. 1997. Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development*. 124:4243-52.
- Kim, S.K., y D.A. Melton. 1998. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:13036-41.
- King, M.L., A. Shaikh, D. Bidwell, A. Voller, y J.E. Banatvala. 1983. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus. *Lancet (London, England)*. 1:1397-9.
- Kissebah, A.H., y A.N. Peiris. 1989. Biology of regional body fat distribution: relationship to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes. Metab. Rev*. 5:83-109.
- Klein, A., K. Lillemoe, C. Yeo, y H. Pitt. 1996. Liver, biliary tract and pancreas. *En Physilogic Basis of Surgery*. W. and Wilkins, editor. Baltimore. 441-78.
- Klein, D., R. Misawa, V. Bravo-Egana, N. Vargas, S. Rosero, J. Piroso, H. Ichii, O. Umland, J. Zhijie, N. Tsinoremas, C. Ricordi, L. Inverardi, J. Domínguez-Bendala, y R.L. Pastori. 2013. MicroRNA Expression in Alpha and Beta Cells of Human Pancreatic Islets. *PLoS One*. 8:e55064.
- Kloosterman, W.P., A.K. Lagendijk, R.F. Ketting, J.D. Moulton, y R.H. a Plasterk. 2007. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol*. 5:1738-49.
- Knoblich, J.A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 132:583-97.
- Kolb, H., y V. Burkart. 1999. Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care*. 22 Suppl 2:B16-20.
- Kolterman, O.G., R.S. Gray, J. Griffin, P. Burstein, J. Insel, J.A. Scarlett, y J.M. Olefsky. 1981. Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest*. 68:957-69.
- Kredo-Russo, S., a. D. Mandelbaum, a. Ness, I. Alon, K. a. Lennox, M. a. Behlke, y E. Hornstein. 2012a. Pancreas-enriched miRNA refines endocrine cell differentiation. *Development*. 139:3021-31.
- Kredo-Russo, S., A. Ness, A.D. Mandelbaum, M.D. Walker, y E. Hornstein. 2012b. Regulation of pancreatic microRNA-7 expression. *Exp. Diabetes Res*. 2012:695214.
- Krol, J., I. Loedige, y W. Filipowicz. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet*. 11:597-610.

- Kroon, E., L. a Martinson, K. Kadoya, A.G. Bang, O.G. Kelly, S. Eliazar, H. Young, M. Richardson, N.G. Smart, J. Cunningham, A.D. Agulnick, K. a D'Amour, M.K. Carpenter, y E.E. Baetge. 2008. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* 26:443-52.
- Kubo, A., K. Shinozaki, J.M. Shannon, V. Kouskoff, M. Kennedy, S. Woo, H.J. Fehling, y G. Keller. 2004. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development.* 131:1651-62.
- Kumar, M.S., S.J. Erkeland, R.E. Pester, C.Y. Chen, M.S. Ebert, P.A. Sharp, y T. Jacks. 2008. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:3903-8.
- Kuppusamy, K.T., H. Sperber, y H. Ruohola-Baker. 2013. MicroRNA regulation and role in stem cell maintenance, cardiac differentiation and hypertrophy. *Curr. Mol. Med.* 13:757-64.
- Kuroda, T., M. Tada, H. Kubota, H. Kimura, S. Hatano, H. Suemori, N. Nakatsuji, y T. Tada. 2005. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 25:2475-85.
- Kurtz, C.L., B.C.E. Peck, E.E. Fannin, C. Beysen, J. Miao, S.R. Landstreet, S. Ding, V. Turaga, P.K. Lund, S. Turner, S.B. Biddinger, K.C. Vickers, y P. Sethupathy. 2014. MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes. *Diabetes.* 63:3141-8.
- Kuusisto, J., L. Mykkanen, K. Pyörälä, y M. Laakso. 1994. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes.* 43:960-7.
- Lacy, P.E., y M. Kostianovsky. 1967. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 16:35-9.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, y T. Tuschl. 2002. Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12:735-9.
- Lahmy, R., M. Soleimani, M.H. Sanati, M. Behmanesh, F. Kouhkan, y N. Mobarra. 2014. MiRNA-375 promotes beta pancreatic differentiation in human induced pluripotent stem (hiPS) cells. *Mol. Biol. Rep.* 41:2055-2066.
- Lakey, J.R., G.L. Warnock, M. Brierton, Z. Ao, B.J. Hering, N.J. London, C. Ricordi, F. Corbin, y R. V Rajotte. 1997. Development of an automated computer-controlled islet isolation system. *Cell Transplant.* 6:47-57.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409:860-921.
- Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A.O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N.D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foà, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.-U. Müller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D.B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.-I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C.E. Rogler, J.W. Nagle, J. Ju, F.N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M.J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J.J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, G. De Vita, D. Frezzetti, J.W. Nagle, J. Ju, F.N. Papavasiliou, T. Benzing, J.J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, M. Landthaler, C. Lin, N.D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foà, J. Schliwka, U.

- Fuchs, A. Novosel, R.-U. Müller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D.B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.-I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C.E. Rogler, J.W. Nagle, J. Ju, F.N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M.J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, et al. 2007. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*. 129:1401-14.
- Larsen, L., M.W. Rosenstjerne, L.W. Gaarn, A. Bagge, L. Pedersen, C.M. Dahmcke, J.H. Nielsen, y L.T. Dalgaard. 2011. Expression and localization of microRNAs in perinatal rat pancreas: role of miR-21 in regulation of cholesterol metabolism. *PLoS One*. 6:e25997.
- Larsen, S., J. Hilsted, B. Tronier, y H. Worning. 1987. Metabolic control and B cell function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis. *Metabolism*. 36:964-7.
- Latreille, M., J. Hausser, I. Stützer, Q. Zhang, B. Hastoy, S. Gargani, J. Kerr-Conte, F. Pattou, M. Zavolan, J.L.S. Esguerra, L. Eliasson, T. Rülcke, P. Rorsman, y M. Stoffel. 2014. MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function. *J. Clin. Invest*. 124:2722-35.
- Lau, J., y M. Hebrok. 2010. Hedgehog signaling in pancreas epithelium regulates embryonic organ formation and adult beta-cell function. *Diabetes*. 59:1211-21.
- St. Laurent, G., C. Wahlestedt, y P. Kapranov. 2015. The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet*. 31:239-51.
- Lee, C.S., N.J. Sund, M.Z. Vatamaniuk, F.M. Matschinsky, D.A. Stoffers, y K.H. Kaestner. 2002. Foxa2 controls Pdx1 gene expression in pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes*. 51:2546-51.
- Lee, H., S. Han, C.S. Kwon, y D. Lee. 2016. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell*. 7:100-13.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, y V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75:843-54.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Rådmark, S. Kim, y V.N. Kim. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425:415-19.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek, y V.N. Kim. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 23:4051-60.
- León-Quinto, T., J. Jones, A. Skoudy, M. Burcin, y B. Soria. 2004. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia*. 47:1442-51.
- Lewis, B.P., C.B. Burge, y D.P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120:15-20.
- Li, Y., X. Xu, Y. Liang, S. Liu, H. Xiao, F. Li, H. Cheng, y Z. Fu. 2010. miR-375 enhances palmitate-induced lipoapoptosis in insulin-secreting NIT-1 cells by repressing myotrophin (V1) protein expression. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 3:254-64.
- Li, Z., C.-S. Yang, K. Nakashima, y T.M. Rana. 2011. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J*. 30:823-34.
- Liao, B., X. Bao, L. Liu, S. Feng, A. Zovoilis, W. Liu, Y. Xue, J. Cai, X. Guo, B. Qin, R. Zhang, J. Wu, L. Lai, M. Teng, L. Niu, B. Zhang, M.A. Esteban, y D. Pei. 2011. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J. Biol. Chem*. 286:17359-64.
- Lim, L.P., N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley, y J.M. Johnson. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*.

433:769-73.

- Lin, C.-H., A.L. Jackson, J. Guo, P.S. Linsley, y R.N. Eisenman. 2009. Myc-regulated microRNAs attenuate embryonic stem cell differentiation. *EMBO J.* 28:3157-70.
- Lin, H.-Y., C.-C. Tsai, L.-L. Chen, S.-H. Chiou, Y.-J. Wang, y S.-C. Hung. 2010. Fibronectin and laminin promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells through activating Akt and ERK. *J. Biomed. Sci.* 17:56.
- Lin, S.-L., D.C. Chang, S. Chang-Lin, C.-H. Lin, D.T.S. Wu, D.T. Chen, y S.-Y. Ying. 2008. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA.* 14:2115-24.
- Lin, S.-L., J.D. Miller, y S.-Y. Ying. 2006. Intronic microRNA (miRNA). *J. Biomed. Biotechnol.* 2006:26818.
- Liu, J., M.A. Valencia-Sanchez, G.J. Hannon, y R. Parker. 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7:719-23.
- Liu, S.-H., y L.-T. Lee. 2012. Efficient Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Insulin-Producing Cells. *Exp. Diabetes Res.* 2012:1-5.
- Liu, X.-Y., Y.-J. He, Q.-H. Yang, W. Huang, Z.-H. Liu, G.-R. Ye, S.-H. Tang, y J.-C. Shu. 2015. Induction of autophagy and apoptosis by miR-148a through the sonic hedgehog signaling pathway in hepatic stellate cells. *Am. J. Cancer Res.* 5:2569-89.
- Liu, Z., y J.F. Habener. 2010. Wnt signaling in pancreatic islets. *Adv. Exp. Med. Biol.* 654:391-419.
- Livak, K.J., y T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-8.
- Loh, Y.-H., Q. Wu, J.-L. Chew, V.B. Vega, W. Zhang, X. Chen, G. Bourque, J. George, B. Leong, J. Liu, K.-Y. Wong, K.W. Sung, C.W.H. Lee, X.-D. Zhao, K.-P. Chiu, L. Lipovich, V.A. Kuznetsov, P. Robson, L.W. Stanton, C.-L. Wei, Y. Ruan, B. Lim, y H.-H. Ng. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38:431-40.
- Lovis, P., S. Gattesco, y R. Regazzi. 2008. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biol. Chem.* 389:305-12.
- Luger, K., A.W. Mäder, R.K. Richmond, D.F. Sargent, y T.J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 389:251-60.
- Lujambio, A., S. Ropero, E. Ballestar, M.F. Fraga, C. Cerrato, F. Setién, S. Casado, A. Suarez-Gauthier, M. Sanchez-Céspedes, A. Git, A. Gitt, I. Spiteri, P.P. Das, C. Caldas, E. Miska, y M. Esteller. 2007. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 67:1424-9.
- Lumelsky, N., O. Blondel, P. Laeng, I. Velasco, R. Ravin, y R. McKay. 2001. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 292:1389-94.
- Lund, E., S. Güttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg, y U. Kutay. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 303:95-8.
- Lynn, F.C.F.C.F.C.F.C.F.C., P. Skewes-Cox, Y. Kosaka, M.T.M.T.T.M.T. McManus, B.D.B.D.D. Harfe, y M.S.M.S.M.S.M.S.M.S. German. 2007. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes.* 56:2938-45.
- Lyttle, B.M., J. Li, M. Krishnamurthy, F. Fellows, M.B. Wheeler, C.G. Goodyer, y R. Wang. 2008. Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia.* 51:1169-80.
- MacDonald, R.J., G.H. Swift, y F.X. Real. 2010. Transcriptional control of acinar development and homeostasis. *Prog.*

- Mol. Biol. Transl. Sci.* 97:1-40.
- Maclean, H. 1926. Some Observations on Diabetes and Insulin in General Practice. *Postgrad. Med. J.* 1:73-7.
- Maldonado, T.S., A.S. Kadison, C.A. Crisera, J.B. Grau, S.L. Alkasab, M.T. Longaker, y G.K. Gittes. Ontogeny of activin B and follistatin in developing embryonic mouse pancreas: implications for lineage selection. *J. Gastrointest. Surg.* 4:269-75.
- Marson, A., S.S. Levine, M.F. Cole, G.M. Frampton, T. Brambrink, S. Johnstone, M.G. Guenther, W.K. Johnston, M. Wernig, J. Newman, J.M. Calabrese, L.M. Dennis, T.L. Volkert, S. Gupta, J. Love, N. Hannett, P.A. Sharp, D.P. Bartel, R. Jaenisch, y R.A. Young. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell.* 134:521-33.
- Martello, G., L. Zacchigna, M. Inui, M. Montagner, M. Adorno, A. Mamidi, L. Morsut, S. Soligo, U. Tran, S. Dupont, M. Cordenonsi, O. Wessely, y S. Piccolo. 2007. MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature.* 449:183-8.
- Martín, M., J. Gallego-Llamas, V. Ribes, M. Kedinger, K. Niederreither, P. Chambon, P. Dollé, y G. Gradwohl. 2005. Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice. *Dev. Biol.* 284:399-411.
- Martinez, N.J., y R.I. Gregory. 2010. MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. *Cell Stem Cell.* 7:31-5.
- Maruyama, M., T. Ichisaka, M. Nakagawa, y S. Yamanaka. 2005. Differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280:24371-9.
- Massirer, K.B., y A.E. Pasquinelli. 2006. The evolving role of microRNAs in animal gene expression. *Bioessays.* 28:449-52.
- Mastsumara, G., y M. England. 1996. Embriología representaciones gráficas. En Mosby/Doyma libros. 208.
- Masui, S., Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A.A. Sharov, M.S.H. Ko, y H. Niwa. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 9:625-35.
- Mathieu, J., y H. Ruohola-Baker. 2013. Regulation of stem cell populations by microRNAs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 786:329-51.
- May, C.L. The role of Islet-1 in the endocrine pancreas: Lessons from pancreas specific Islet-1 deficient mice. *Islets.* 2:121-3.
- McLean, A.B., K.A. D'Amour, K.L. Jones, M. Krishnamoorthy, M.J. Kulik, D.M. Reynolds, A.M. Sheppard, H. Liu, Y. Xu, E.E. Baetge, y S. Dalton. 2007. Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells.* 25:29-38.
- Melkman-Zehavi, T., R. Oren, S. Kredo-Russo, T. Shapira, A.D. Mandelbaum, N. Rivkin, T. Nir, K.A. Lennox, M.A. Behlke, Y. Dor, y E. Hornstein. 2011. miRNAs control insulin content in pancreatic β -cells via downregulation of transcriptional repressors. *EMBO J.* 30:835-45.
- Melton, C., R.L. Judson, y R. Blelloch. 2010. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature.* 463:621-6.
- Merani, S., C. Toso, J. Emamaullee, y A.M.J. Shapiro. 2008. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br. J. Surg.* 95:1449-61.
- Merglen, A., S. Theander, B. Rubi, G. Chaffard, C.B. Wollheim, y P. Maechler. 2004. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology.* 145:667-78.

- Von Mering, J., y O. Minkowski. 1889. Diabetes mellitus nach Pankreas extirpation. *Zentralbl Klin Med.* 10:393.
- Metzger, B.E. 1991. Summary and recommendations of the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 40 Suppl 2:197-201.
- Mfopou, J.K., y L. Bouwens. 2008. Hedgehog signals in pancreatic differentiation from embryonic stem cells: revisiting the neglected. *Differentiation.* 76:107-17.
- Mfopou, J.K., B. Chen, I. Mateizel, K. Sermon, y L. Bouwens. 2010. Noggin, Retinoids, and Fibroblast Growth Factor Regulate Hepatic or Pancreatic Fate of Human Embryonic Stem Cells. *Gastroenterology.* 138:2233-2245.e14.
- Mfopou, J.K., V. De Groote, X. Xu, H. Heimberg, y L. Bouwens. 2007. Sonic hedgehog and other soluble factors from differentiating embryoid bodies inhibit pancreas development. *Stem Cells.* 25:1156-65.
- Micallef, S.J., M.E. Janes, K. Knezevic, R.P. Davis, A.G. Elefanty, y E.G. Stanley. 2005. Retinoic acid induces Pdx1-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells. *Diabetes.* 54:301-5.
- Minkowski, O. 1893. Untersuchungen iiber den Diabetes Mellitus nach Extirpation des Pankreas. *Pharmakol.* 31:85.
- Miralles, F., P. Czernichow, K. Ozaki, N. Itoh, y R. Scharfmann. 1999. Signaling through fibroblast growth factor receptor 2b plays a key role in the development of the exocrine pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:6267-72.
- Mirsky, I.A., R. Jinks, y G. Perisutti. 1963. The isolation and crystallization of human insulin. *J. Clin. Invest.* 42:1869-72.
- Miyabayashi, T., J.-L. Teo, M. Yamamoto, M. McMillan, C. Nguyen, y M. Kahn. 2007. Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:5668-73.
- Miyoshi, N., H. Ishii, H. Nagano, N. Haraguchi, D.L. Dewi, Y. Kano, S. Nishikawa, M. Tanemura, K. Mimori, F. Tanaka, T. Saito, J. Nishimura, I. Takemasa, T. Mizushima, M. Ikeda, H. Yamamoto, M. Sekimoto, Y. Doki, y M. Mori. 2010. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell.* 8:633-8.
- Molotkov, A., N. Molotkova, y G. Duester. 2005. Retinoic acid generated by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev. Dyn.* 232:950-7.
- Morita, S., T. Horii, M. Kimura, Y. Goto, T. Ochiya, y I. Hatada. 2007. One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics.* 89:687-96.
- Moriya, N., S. Komazaki, S. Takahashi, C. Yokota, y M. Asashima. 2000. In vitro pancreas formation from Xenopus ectoderm treated with activin and retinoic acid. *Dev. Growth Differ.* 42:593-602.
- Morrison, A.J., y X. Shen. 2009. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:373-84.
- Moss, S.E., R. Klein, B.E. Klein, y S.M. Meuer. 1994. The association of glycemia and cause-specific mortality in a diabetic population. *Arch. Intern. Med.* 154:2473-9.
- Moynihan, K.A., A.A. Grimm, M.M. Plueger, E. Bernal-Mizrachi, E. Ford, C. Cras-Méneur, M.A. Permutt, y S.-I. Imai. 2005. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab.* 2:105-17.
- Mu, C., T. Wang, X. Wang, H. Tian, y Y. Liu. 2016. Identification of microRNAs regulating Hlx9 gene expression during the induction of insulin-producing cells. *Cell Biol. Int.* 40:515-23.
- Mullin, N.P., A. Yates, A.J. Rowe, B. Nijmeijer, D. Colby, P.N. Barlow, M.D. Walkinshaw, y I. Chambers. 2008. The pluripotency rheostat Nanog functions as a dimer. *Biochem. J.* 411:227-31.

- Muraoka, N., H. Yamakawa, K. Miyamoto, T. Sadahiro, T. Umei, M. Isomi, H. Nakashima, M. Akiyama, R. Wada, K. Inagawa, T. Nishiyama, R. Kaneda, T. Fukuda, S. Takeda, S. Tohyama, H. Hashimoto, Y. Kawamura, N. Goshima, R. Aeba, H. Yamagishi, K. Fukuda, y M. Ieda. 2014. MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing Snai1 and silencing fibroblast signatures. *EMBO J.* 33:1565-81.
- Murchison, E.P., J.F. Partridge, O.H. Tam, S. Cheloufi, y G.J. Hannon. 2005. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:12135-40.
- National Diabetes Data Group. 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. - PubMed - NCBI. *Diabetes.* 28:1039-57.
- Nesbit, C.E., J.M. Tersak, y E. V Prochownik. 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene.* 18:3004-16.
- Newman, B., J. V Selby, M.C. King, C. Slemenda, R. Fabsitz, y G.D. Friedman. 1987. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia.* 30:763-8.
- Nichols, J., y A. Smith. 2012. Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a008128.
- Nieto, M., P. Hevia, E. Garcia, D. Klein, S. Alvarez-Cubela, V. Bravo-Egana, S. Rosero, R. Damaris Molano, N. Vargas, C. Ricordi, A. Pileggi, J. Diez, J. Domínguez-Bendala, y R.L. Pastori. 2012. Antisense miR-7 impairs insulin expression in developing pancreas and in cultured pancreatic buds. *Cell Transplant.* 21:1761-74.
- Nimmo, R. a., y F.J. Slack. 2009. An elegant miRror: microRNAs in stem cells, developmental timing and cancer. *Chromosoma.* 118:405-18.
- Nishimoto, M., A. Fukushima, A. Okuda, y M. Muramatsu. 1999. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol. Cell. Biol.* 19:5453-65.
- Niwa, H., J. Miyazaki, y A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24:372-6.
- Noggle, S.A., D. James, y A.H. Brivanlou. 2005. A molecular basis for human embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Rev.* 1:111-8.
- Nostro, M.C., F. Sarangi, S. Ogawa, A. Holtzinger, B. Corneo, X. Li, S.J. Micallef, I.-H. Park, C. Basford, M.B. Wheeler, G.Q. Daley, A.G. Elefanty, E.G. Stanley, y G. Keller. 2011. Stage-specific signaling through TGF β family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. *Development.* 138:861-71.
- O'Byrne, S., y J. Feely. 1990. Effects of drugs on glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetics (Part II). *Drugs.* 40:203-19.
- O'Donnell, K.A., E.A. Wentzel, K.I. Zeller, C. V. Dang, y J.T. Mendell. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 435:839-43.
- O'Loughlen, A., A.M. Muñoz-Cabello, A. Gaspar-Maia, H.-A. Wu, A. Banito, N. Kunowska, T. Racek, H.N. Pemberton, P. Beolchi, F. Lavial, O. Masui, M. Vermeulen, T. Carroll, J. Graumann, E. Heard, N. Dillon, V. Azuara, A.P. Snijders, G. Peters, E. Bernstein, y J. Gil. 2012. MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation. *Cell Stem Cell.* 10:33-46.
- Offield, M.F., T.L. Jetton, P.A. Labosky, M. Ray, R.W. Stein, M.A. Magnuson, B.L. Hogan, y C. V Wright. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development.* 122:983-95.
- Ohtsuka, S., y S. Dalton. 2008. Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Ther.* 15:74-81.

- Okamura, K., N. Liu, y E.C. Lai. 2009. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol. Cell.* 36:431-44.
- Okumura-Nakanishi, S., M. Saito, H. Niwa, y F. Ishikawa. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280:5307-17.
- Olefsky, J.M., O.G. Kolterman, y J.A. Scarlett. 1982. Insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* 243:E15-30.
- Ong, S.-G., W.H. Lee, K. Kodo, y J.C. Wu. 2015. MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 88:3-15.
- Orian, A., B. van Steensel, J. Delrow, H.J. Bussemaker, L. Li, T. Sawado, E. Williams, L.W.M. Loo, S.M. Cowley, C. Yost, S. Pierce, B.A. Edgar, S.M. Parkhurst, y R.N. Eisenman. 2003. Genomic binding by the *Drosophila* Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev.* 17:1101-14.
- Oström, M., K.A. Löffler, S. Edfalk, L. Selander, U. Dahl, C. Ricordi, J. Jeon, M. Correa-Medina, J. Diez, y H. Edlund. 2008. Retinoic acid promotes the generation of pancreatic endocrine progenitor cells and their further differentiation into beta-cells. *PLoS One.* 3:e2841.
- Otonkoski, T., G.M. Beattie, M.I. Mally, C. Ricordi, y A. Hayek. 1993. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *J. Clin. Invest.* 92:1459-66.
- El Ouaamari, A., N. Baroukh, G.A. Martens, P. Lebrun, D. Pipeleers, y E. van Obberghen. 2008. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 57:2708-17.
- Pagliuca, F.W., J.R. Millman, M. Gürtler, M. Segel, A. Van Dervort, J.H. Ryu, Q.P. Peterson, D. Greiner, y D.A. Melton. 2014. Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. *Cell.* 159:428-39.
- Pak, C.Y., H.M. Eun, R.G. McArthur, y J.W. Yoon. 1988. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet (London, England).* 2:1-4.
- Pan, F.C., y C. Wright. 2011. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev. Dyn.* 240:530-65.
- Pandit, M.K., J. Burke, A.B. Gustafson, A. Minocha, y A.N. Peiris. 1993. Drug-induced disorders of glucose tolerance. *Ann. Intern. Med.* 118:529-39.
- Park, I.-H., P.H. Lerou, R. Zhao, H. Huo, y G.Q. Daley. 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 3:1180-6.
- Peyton, M., C.M. Stellrecht, F.J. Naya, H.P. Huang, P.J. Samora, y M.J. Tsai. 1996. BETA3, a novel helix-loop-helix protein, can act as a negative regulator of BETA2 and MyoD-responsive genes. *Mol. Cell. Biol.* 16:626-33.
- Pezzolla, D., J. López-Beas, C.C. Lachaud, A. Domínguez-Rodríguez, T. Smani, A. Hmadcha, y B. Soria. 2015. Resveratrol Ameliorates the Maturation Process of β -Cell-Like Cells Obtained from an Optimized Differentiation Protocol of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One.* 10:e0119904.
- Pfaff, N., J. Fiedler, A. Holzmann, A. Schambach, T. Moritz, T. Cantz, y T. Thum. 2011. miRNA screening reveals a new miRNA family stimulating iPS cell generation via regulation of Meox2. *EMBO Rep.* 12:1153-9.
- Phillips, B.W., H. Hentze, W.L. Rust, Q.-P. Chen, H. Chipperfield, E.-K. Tan, S. Abraham, A. Sadasivam, P.L. Soong, S.T. Wang, R. Lim, W. Sun, A. Colman, y N.R. Dunn. 2007. Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. *Stem Cells Dev.* 16:561-78.
- Pickup, J.C., H. Keen, J.A. Parsons, y K.G. Alberti. 1978. Continuous subcutaneous insulin infusion: an approach to achieving normoglycaemia. *Br. Med. J.* 1:204-7.

- Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, C.G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, y W. Filipowicz. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 309:1573-6.
- Pin, C.L., J.M. Rukstalis, C. Johnson, y S.F. Konieczny. 2001. The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J. Cell Biol.* 155:519-30.
- Piper, K., S. Brickwood, L.W. Turnpenny, I.T. Cameron, S.G. Ball, D.I. Wilson, y N.A. Hanley. 2004. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J. Endocrinol.* 181:11-23.
- Poh, Y.-C., J. Chen, Y. Hong, H. Yi, S. Zhang, J. Chen, D.C. Wu, L. Wang, Q. Jia, R. Singh, W. Yao, Y. Tan, A. Tajik, T.S. Tanaka, y N. Wang. 2014. Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell. *Nat. Commun.* 5:4000.
- Poll, A. V., C.E. Pierreux, L. Lokmane, C. Haumaitre, Y. Achouri, P. Jacquemin, G.G. Rousseau, S. Cereghini, y F.P. Lemaigre. 2006. A vHNF1/TCF2-HNF6 cascade regulates the transcription factor network that controls generation of pancreatic precursor cells. *Diabetes*. 55:61-9.
- Poy, M.N., L. Eliasson, J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, X. Ma, P.E. Macdonald, S. Pfeffer, T. Tuschl, N. Rajewsky, P. Rorsman, y M. Stoffel. 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 432:226-30.
- Poy, M.N., J. Hausser, M. Trajkovski, M. Braun, S. Collins, P. Rorsman, M. Zavolan, y M. Stoffel. 2009. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:5813-18.
- Puigserver, P., y J.T. Rodgers. 2006. Foxa2, a novel transcriptional regulator of insulin sensitivity. *Nat. Med.* 12:38-9.
- Pullen, T.J., G. da Silva Xavier, G. Kelsey, y G. a Rutter. 2011. miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Mol. Cell. Biol.* 31:3182-94.
- Qi, J., J.-Y. Yu, H.R. Shcherbata, J. Mathieu, A.J. Wang, S. Seal, W. Zhou, B.M. Stadler, D. Bourgin, L. Wang, A. Nelson, C. Ware, C. Raymond, L.P. Lim, J. Magnus, I. Ivanovska, R. Diaz, A. Ball, M.A. Cleary, y H. Ruohola-Baker. 2009. microRNAs regulate human embryonic stem cell division. *Cell Cycle*. 8:3729-41.
- Rao, S., y S.H. Orkin. 2006. Unraveling the transcriptional network controlling ES cell pluripotency. *Genome Biol.* 7:230.
- Reaven, G.M., R. Bernstein, B. Davis, y J.M. Olefsky. 1976. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? *Am. J. Med.* 60:80-8.
- Reinhart, B.J., F.J. Slack, M. Basson, a E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, a E. Rougvie, H.R. Horvitz, y G. Ruvkun. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901-6.
- Rezania, A., J.E. Bruin, P. Arora, A. Rubin, I. Batushansky, A. Asadi, S. O'Dwyer, N. Quiskamp, M. Mojibian, T. Albrecht, Y.H.C. Yang, J.D. Johnson, y T.J. Kieffer. 2014. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 32:1121-33.
- Rezania, A., J.E. Bruin, M.J. Riedel, M. Mojibian, A. Asadi, J. Xu, R. Gauvin, K. Narayan, F. Karanu, J.J. O'Neil, Z. Ao, G.L. Warnock, y T.J. Kieffer. 2012. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes*. 61:2016-29.
- Rezania, A., M.J. Riedel, R.D. Wideman, F. Karanu, Z. Ao, G.L. Warnock, y T.J. Kieffer. 2011. Production of functional glucagon-secreting α -cells from human embryonic stem cells. *Diabetes*. 60:239-47.
- Ricordi, C., P.E. Lacy, E.H. Finke, B.J. Olack, y D.W. Scharp. 1988. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 37:413-20.
- Riedel, M.J., A. Asadi, R. Wang, Z. Ao, G.L. Warnock, y T.J. Kieffer. 2012. Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. *Diabetologia*. 55:372-81.

- Ritchie, M.E., J. Silver, A. Oshlack, M. Holmes, D. Diyagama, A. Holloway, y G.K. Smyth. 2007. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*. 23:2700-7.
- Roche, E., R. Enseñat-Waser, J.A. Reig, J. Jones, T. León-Quinto, y B. Soria. 2006. Therapeutic potential of stem cells in diabetes. *Handb. Exp. Pharmacol.* 147-67.
- Rodda, D.J., J.-L. Chew, L.-H. Lim, Y.-H. Loh, B. Wang, H.-H. Ng, y P. Robson. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 280:24731-7.
- Rodgers, J.T., C. Lerin, W. Haas, S.P. Gygi, B.M. Spiegelman, y P. Puigserver. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 434:113-8.
- Rodriguez, A. 2004. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res.* 14:1902-10.
- Roggli, E., A. Britan, S. Gattesco, N. Lin-Marq, A. Abderrahmani, P. Meda, y R. Regazzi. 2010. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic β -cells. *Diabetes*. 59:978-86.
- Roggli, E., S. Gattesco, D. Caille, C. Briet, C. Boitard, P. Meda, y R. Regazzi. 2012. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic β -cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes*. 61:1742-51.
- Rong, Z., M. Wang, Z. Hu, M. Stradner, S. Zhu, H. Kong, H. Yi, A. Goldrath, Y.-G. Yang, Y. Xu, y X. Fu. 2014. An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell*. 14:121-30.
- Rorsman, P., y E. Renström. 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 46:1029-45.
- Rosa, A., M.D. Papaioannou, J.E. Krzyspiak, y A.H. Brivanlou. 2014. MiR-373 is regulated by TGF β signaling and promotes mesendoderm differentiation in human embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 391:81-8.
- Rosenfeld, L. 2002. Insulin: discovery and controversy. *Clin. Chem.* 48:2270-88.
- Rosero, S., V. Bravo-Egana, Z. Jiang, S. Khuri, N. Tsinoremas, D. Klein, E. Sabates, M. Correa-Medina, C. Ricordi, J. Domínguez-Bendala, J. Diez, y R.L. Pastori. 2010. MicroRNA signature of the human developing pancreas. *BMC Genomics*. 11:509.
- Russ, H.A., A. V Parent, J.J. Ringler, T.G. Hennings, G.G. Nair, M. Shveygert, T. Guo, S. Puri, L. Haataja, V. Cirulli, R. Blelloch, G.L. Szot, P. Arvan, y M. Hebrok. 2015. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *EMBO J.* 34:1759-72.
- Ruvkun, G., y J. Giusto. 1989. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature*. 338:313-9.
- Rybak, A., H. Fuchs, L. Smirnova, C. Brandt, E.E. Pohl, R. Nitsch, y F.G. Wulczyn. 2008. A feedback loop comprising *lin-28* and *let-7* controls pre-*let-7* maturation during neural stem-cell commitment. *Nat. Cell Biol.* 10:987-93.
- Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J.M. Friedman, J.C. Chuang, G.A. Coetzee, y P.A. Jones. 2006. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 9:435-43.
- Salguero-Aranda, C., R. Tapia-Limonchi, G.M. Cahuana, A.B. Hitos, I. Diaz, A. Hmadcha, M. Fraga, F. Martín, B. Soria, J.R. Tejedo, y F.J. Bedoya. 2016. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Towards Functional Pancreatic Beta-Cell Surrogates through Epigenetic Regulation of Pdx1 by Nitric Oxide. *Cell Transplant.*
- Salunkhe, V. a., J.L.S. Esguerra, J.K. Ofori, I.G. Mollet, M. Braun, M. Stoffel, a. Wendt, y L. Eliasson. 2015. Modulation of microRNA-375 expression alters voltage-gated Na⁺ channel properties and exocytosis in insulin-secreting cells. *Acta Physiol.* 213:882-92.

- Sander, M., A. Neubüser, J. Kalamaras, H.C. Ee, G.R. Martin, y M.S. German. 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev.* 11:1662-73.
- Scarlett, J.A., R.S. Gray, J. Griffin, J.M. Olefsky, y O.G. Kolterman. Insulin treatment reverses the insulin resistance of type II diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 5:353-63.
- Scharp, D.W., J.J. Murphy, W.T. Newton, W.F. Ballinger, y P.E. Lacy. 1975. Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys. *Surgery.* 77:100-5.
- Schisler, J.C., P.B. Jensen, D.G. Taylor, T.C. Becker, F.K. Knop, S. Takekawa, M. German, G.C. Weir, D. Lu, R.G. Mirmira, y C.B. Newgard. 2005. The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:7297-302.
- Schroeder, I.S., A. Rolletschek, P. Blyszczuk, G. Kania, y A.M. Wobus. 2006. Differentiation of mouse embryonic stem cells to insulin-producing cells. *Nat. Protoc.* 1:495-507.
- Schuldiner, M., O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, D.A. Melton, y N. Benvenisty. 2000. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:11307-12.
- Schultz, J., P. Lorenz, G. Gross, S. Ibrahim, y M. Kunz. 2008. MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res.* 18:549-57.
- Schulz, T.C., H.Y. Young, A.D. Agulnick, M.J. Babin, E.E. Baetge, A.G. Bang, A. Bhoumik, I. Cepa, R.M. Cesario, C. Haakmeester, K. Kadota, J.R. Kelly, J. Kerr, L.A. Martinson, A.B. McLean, M.A. Moorman, J.K. Payne, M. Richardson, K.G. Ross, E.S. Sherrer, X. Song, A.Z. Wilson, E.P. Brandon, C.E. Green, E.J. Kroon, O.G. Kelly, K.A. D'Amour, y A.J. Robins. 2012. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One.* 7:e37004.
- Schwarz, D.S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, y P.D. Zamore. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 115:199-208.
- Segev, H., B. Fishman, A. Ziskind, M. Shulman, y J. Itskovitz-Eldor. 2004. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells.* 22:265-74.
- Selbach, M., B. Schwanhäusser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, y N. Rajewsky. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 455:58-63.
- Sen, G.L., y H.M. Blau. 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* 7:633-6.
- Shannon, J.M., y B.A. Hyatt. 2004. Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. *Annu. Rev. Physiol.* 66:625-45.
- Shapiro, A.M., J.R. Lakey, E.A. Ryan, G.S. Korbitt, E. Toth, G.L. Warnock, N.M. Kneteman, y R. V Rajotte. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343:230-8.
- Shapiro, A.M.J., C. Ricordi, B.J. Hering, H. Auchincloss, R. Lindblad, R.P. Robertson, A. Secchi, M.D. Brendel, T. Berney, D.C. Brennan, E. Cagliero, R. Alejandro, E.A. Ryan, B. DiMercurio, P. Morel, K.S. Polonsky, J.-A. Reems, R.G. Bretzel, F. Bertuzzi, T. Froud, R. Kandaswamy, D.E.R. Sutherland, G. Eisenbarth, M. Segal, J. Preiksaitis, G.S. Korbitt, F.B. Barton, L. Viviano, V. Seyfert-Margolis, J. Bluestone, y J.R.T. Lakey. 2006. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N. Engl. J. Med.* 355:1318-30.
- Shekar, P.C., A. Naim, D.P. Sarathi, y S. Kumar. 2011. Argonaute-2-null embryonic stem cells are retarded in self-

- renewal and differentiation. *J. Biosci.* 36:649-57.
- Shen, M.M. 2007. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development.* 134:1023-34.
- Sherwood, R.I., T.-Y.A. Chen, y D.A. Melton. 2009. Transcriptional dynamics of endodermal organ formation. *Dev. Dyn.* 238:29-42.
- Shi, W., H. Wang, G. Pan, Y. Geng, Y. Guo, y D. Pei. 2006. Regulation of the Pluripotency Marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J. Biol. Chem.* 281:23319-25.
- Shi, Y., L. Hou, F. Tang, W. Jiang, P. Wang, M. Ding, y H. Deng. 2005. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells.* 23:656-62.
- Shim, J., y J.-W. Nam. 2016. The expression and functional roles of microRNAs in stem cell differentiation. *BMB Rep.* 49:3-10.
- Shim, J.H., S.E. Kim, D.H. Woo, S.K. Kim, C.H. Oh, R. McKay, y J.H. Kim. 2007. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia.* 50:1228-38.
- Shiozaki, S., T. Tajima, Y.Q. Zhang, M. Furukawa, Y. Nakazato, y I. Kojima. 1999. Impaired differentiation of endocrine and exocrine cells of the pancreas in transgenic mouse expressing the truncated type II activin receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1450:1-11.
- Shiroi, A., M. Yoshikawa, H. Yokota, H. Fukui, S. Ishizaka, K. Tatsumi, y Y. Takahashi. 2002. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells.* 20:284-92.
- Silva, J., J. Nichols, T.W. Theunissen, G. Guo, A.L. van Oosten, O. Barrandon, J. Wray, S. Yamanaka, I. Chambers, y A. Smith. 2009. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell.* 138:722-37.
- Simó, R., y C. Hernández. 2002. [Treatment of diabetes mellitus: general goals, and clinical practice management]. *Rev. española Cardiol.* 55:845-60.
- Simonson, D.C., E. Ferrannini, S. Bevilacqua, D. Smith, E. Barrett, R. Carlson, y R.A. DeFronzo. 1984. Mechanism of improvement in glucose metabolism after chronic glyburide therapy. *Diabetes.* 33:838-45.
- Singh, A.M., y S. Dalton. 2009. The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell.* 5:141-9.
- Sinkkonen, L., T. Hugenschmidt, P. Berninger, D. Gaidatzis, F. Mohn, C.G. Artus-Revel, M. Zavolan, P. Svoboda, y W. Filipowicz. 2008. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:259-67.
- Slack, F.J., M. Basson, Z. Liu, V. Ambros, H.R. Horvitz, y G. Ruvkun. 2000. The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell.* 5:659-69.
- Smalheiser, N.R., y V.I. Torvik. 2005. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends Genet.* 21:322-6.
- Smyth, G.K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3:Article3.
- Son, M.-Y., H. Choi, Y.-M. Han, y Y. Sook Cho. 2013. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells.* 31:2374-87.
- Song, S.Y., M. Gannon, M.K. Washington, C.R. Scoggins, I.M. Meszoely, J.R. Goldenring, C.R. Marino, E.P. Sandgren, R.J. Coffey, C. V Wright, y S.D. Leach. 1999. Expansion of Pdx1-expressing pancreatic epithelium and islet neogenesis in transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. *Gastroenterology.* 117:1416-

26.

- Sordi, V., F. Bertuzzi, y L. Piemonti. 2008. Diabetes mellitus: an opportunity for therapy with stem cells? *Regen. Med.* 3:377-97.
- Soria, B., F.J. Bedoya, J.R. Tejedo, A. Hmadcha, R. Ruiz-Salmerón, S. Lim, y F. Martín. 2008. Cell therapy for diabetes mellitus: an opportunity for stem cells? *Cells. Tissues. Organs.* 188:70-7.
- Soria, B., E. Montanya, F. Martín, y A. Hmadcha. 2016. A Role for the Host in the Roadmap to Diabetes Stem Cell Therapy. *Diabetes.* 65:1155-7.
- Soria, B., E. Roche, G. Berná, T. León-Quinto, J.A. Reig, y F. Martín. 2000. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. - PubMed - NCBI. *Diabetes.* 49:157-62.
- Soria, B., A. Skoudy, y F. Martín. 2001. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 44:407-15.
- Soriguer, F., A. Goday, A. Bosch-Comas, E. Bordiú, A. Calle-Pascual, R. Carmena, R. Casamitjana, L. Castaño, C. Castell, M. Catalá, E. Delgado, J. Franch, S. Gaztambide, J. Gorbés, R. Gomis, G. Gutiérrez, A. López-Alba, M.T. Martínez-Larrad, E. Menéndez, I. Mora-Peces, E. Ortega, G. Pascual-Manich, G. Rojo-Martínez, M. Serrano-Rios, S. Valdés, J.A. Vázquez, y J. Vendrell. 2012. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia.* 55:88-93.
- Spence, J.R., A.W. Lange, S.-C.J. Lin, K.H. Kaestner, A.M. Lowy, I. Kim, J.A. Whitsett, y J.M. Wells. 2009. Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev. Cell.* 17:62-74.
- Stadler, B., I. Ivanovska, K. Mehta, S. Song, A. Nelson, Y. Tan, J. Mathieu, C. Darby, C.A. Blau, C. Ware, G. Peters, D.G. Miller, L. Shen, M.A. Cleary, y H. Ruohola-Baker. 2010. Characterization of microRNAs involved in embryonic stem cell states. *Stem Cells Dev.* 19:935-50.
- Stafford, D., A. Hornbruch, P.R. Mueller, y V.E. Prince. 2004. A conserved role for retinoid signaling in vertebrate pancreas development. *Dev. Genes Evol.* 214:432-41.
- Stark, A., J. Brennecke, N. Bushati, R.B. Russell, y S.M. Cohen. 2005. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell.* 123:1133-46.
- Stenström, G., I. Ernest, y L.E. Tisell. 1988. Long-term results in 64 patients operated upon for pheochromocytoma. *Acta Med. Scand.* 223:345-52.
- Stevanato, L., y J.D. Sinden. 2014. The effects of microRNAs on human neural stem cell differentiation in two- and three-dimensional cultures. *Stem Cell Res. Ther.* 5:49.
- Subramanyam, D., S. Lamouille, R.L. Judson, J.Y. Liu, N. Bucay, R. Derynck, y R. Blelloch. 2011. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29:443-48.
- Suh, M.-R., Y. Lee, J.Y. Kim, S.-K. Kim, S.Y.S.-H.S.Y. Moon, J.Y. Lee, K.-Y. Cha, H.M. Chung, H.S. Yoon, S.Y.S.-H.S.Y. Moon, V.N. Kim, y K.-S. Kim. 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* 270:488-98.
- Sui, L., L. Bouwens, y J.K. Mfopou. 2013. Signaling pathways during maintenance and definitive endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 57:1-12.
- Sui, L., J.K. Mfopou, M. Geens, K. Sermon, y L. Bouwens. 2012. FGF signaling via MAPK is required early and improves Activin A-induced definitive endoderm formation from human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426:380-5.

- Sun, B., K.-H. Roh, S.-R. Lee, Y.-S. Lee, y K.-S. Kang. 2007. Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:919-23.
- Sun, L.-L.L., B.-G.G. Jiang, W.-T.T. Li, J.-J.J. Zou, Y.-Q.Q. Shi, y Z.-M.M. Liu. 2011. MicroRNA-15a positively regulates insulin synthesis by inhibiting uncoupling protein-2 expression. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 91:94-100.
- Sussel, L., J. Kalamaras, D.J. Hartigan-O'Connor, J.J. Meneses, R.A. Pedersen, J.L. Rubenstein, y M.S. German. 1998. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development.* 125:2213-21.
- Sutherland, D.E., R.W. Gruessner, y A.C. Gruessner. 2001. Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. *World J. Surg.* 25:487-96.
- Szebenyi, G., y J.F. Fallon. 1999. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int. Rev. Cytol.* 185:45-106.
- Tada, S., T. Era, C. Furusawa, H. Sakurai, S.S.-I. Nishikawa, M. Kinoshita, K. Nakao, T. Chiba, y S.S.-I. Nishikawa. 2005. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development.* 132:4363-74.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, y S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131:861-72.
- Takahashi, K., y S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126:663-76.
- Takaya, T., K. Ono, T. Kawamura, R. Takanabe, S. Kaichi, T. Morimoto, H. Wada, T. Kita, A. Shimatsu, y K. Hasegawa. 2009. MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circ. J.* 73:1492-7.
- Tang, X., L. Muniappan, G. Tang, y S. Ozcan. 2009. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA.* 15:287-293.
- Tarasov, V., P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister, y H. Hermeking. 2007. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle.* 6:1586-93.
- Tattikota, S.G., T. Rathjen, S.J. McAnulty, H.-H. Wessels, I. Akerman, M. van de Bunt, J. Hausser, J.L.S. Esguerra, A. Musahl, A.K. Pandey, X. You, W. Chen, P.L. Herrera, P.R. Johnson, D. O'Carroll, L. Eliasson, M. Zavolan, A.L. Gloyn, J. Ferrer, R. Shalom-Feuerstein, D. Aberdam, y M.N. Poy. 2014. Argonaute2 mediates compensatory expansion of the pancreatic β cell. *Cell Metab.* 19:122-34.
- Tattikota, S.G., M.D. Sury, T. Rathjen, H.-H. Wessels, A.K. Pandey, X. You, C. Becker, W. Chen, M. Selbach, y M.N. Poy. 2013. Argonaute2 regulates the pancreatic β -cell secretome. *Mol. Cell. Proteomics.* 12:1214-25.
- Tay, Y., J. Zhang, A.M. Thomson, B. Lim, y I. Rigoutsos. 2008a. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature.* 455:1124-28.
- Tay, Y.M.-S., W.-L. Tam, Y.-S. Ang, P.M. Gaughwin, H. Yang, W. Wang, R. Liu, J. George, H.-H. Ng, R.J. Perera, T. Lufkin, I. Rigoutsos, A.M. Thomson, y B. Lim. 2008b. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. *Stem Cells.* 26:17-29.
- Teo, A.K.K., N. Tsuneyoshi, S. Hoon, E.K. Tan, L.W. Stanton, C.V.E. Wright, y N.R. Dunn. 2015. PDX1 binds and represses hepatic genes to ensure robust pancreatic commitment in differentiating human embryonic stem cells. *Stem cell reports.* 4:578-90.

- Thomas, E.D., H.L. Lochte, J.H. Cannon, O.D. Sahler, y J.W. Ferrebee. 1959. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest.* 38:1709-16.
- Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, y J.M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282:1145-7.
- Tiscornia, G., y J.C. Izpisua Belmonte. 2010. MicroRNAs in embryonic stem cell function and fate. *Genes Dev.* 24:2732-41.
- Toivonen, S., K. Lundin, D. Balboa, J. Ustinov, K. Tamminen, J. Palgi, R. Trokovic, T. Tuuri, y T. Otonkoski. 2013. Activin A and Wnt-dependent specification of human definitive endoderm cells. *Exp. Cell Res.* 319:2535-44.
- Trounson, A. 2006. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr. Rev.* 27:208-19.
- Tsialikas, J., y J. Romer-Seibert. 2015. LIN28: roles and regulation in development and beyond. *Development.* 142:2397-404.
- Turner, R.C., R.R. Holman, D. Matthews, T.D. Hockaday, y J. Peto. 1979. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism.* 28:1086-96.
- Tzakis, A.G., C. Ricordi, R. Alejandro, Y. Zeng, J.J. Fung, S. Todo, A.J. Demetris, D.H. Mintz, y T.E. Starzl. 1990. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. *Lancet (London, England).* 336:402-5.
- Uchizono, Y., C. Alarcón, B.L. Wicksteed, B.J. Marsh, y C.J. Rhodes. 2007. The balance between proinsulin biosynthesis and insulin secretion: where can imbalance lead? *Diabetes. Obes. Metab.* 9 Suppl 2:56-66.
- Umpierrez, G.E., M.M. Casals, S.P. Gebhart, P.S. Mixon, W.S. Clark, y L.S. Phillips. 1995. Diabetic ketoacidosis in obese African-Americans. *Diabetes.* 44:790-5.
- Urano, F. 2016. Wolfram Syndrome: Diagnosis, Management, and Treatment. *Curr. Diab. Rep.* 16:6.
- Uusitupa, M.I., L.K. Niskanen, O. Siitonen, E. Voutilainen, y K. Pyörälä. 1993. Ten-year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia.* 36:1175-84.
- Vaca, P., G. Berná, R. Araujo, E.M. Carneiro, F.J. Bedoya, B. Soria, y F. Martín. 2008. Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells. *Exp. Cell Res.* 314:969-74.
- Vaca, P., F. Martín, J.M. Vegara-Meseguer, J.M. Rovira, G. Berná, y B. Soria. 2006. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells.* 24:258-65.
- Valencia-Sanchez, M.A. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20:515-24.
- Vallier, L., T. Touboul, Z. Chng, M. Brimpari, N. Hannan, E. Millan, L.E. Smithers, M. Trotter, P. Rugg-Gunn, A. Weber, y R. a. Pedersen. 2009. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS One.* 4:e6082.
- Varlakhanova, N. V., R.F. Cotterman, W.N. deVries, J. Morgan, L.R. Donahue, S. Murray, B.B. Knowles, y P.S. Knoepfler. 2010. myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation.* 80:9-19.
- Vaxillaire, M., P. D, A. Bonnefond, y P. Froguel. 2009. Breakthroughs in monogenic diabetes genetics: from pediatric forms to young adulthood diabetes. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 6:405-17.
- Vaxillaire, M., y P. Froguel. 2008. Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to

- multifactorial forms of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 29:254-64.
- Vijayaraghavan, J., E.C. Maggi, y J.S. Crabtree. 2014. miR-24 regulates menin in the endocrine pancreas. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307:E84-92.
- Wandzioch, E., y K.S. Zaret. 2009. Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. *Science*. 324:1707-10.
- Wang, G., H. Zhang, Y. Zhao, J. Li, J. Cai, P. Wang, S. Meng, J. Feng, C. Miao, M. Ding, D. Li, y H. Deng. 2005. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:934-42.
- Wang, Y., S. Baskerville, A. Shenoy, J.E. Babiarz, L. Baehner, y R. Blelloch. 2008. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat. Genet.* 40:1478-83.
- Wang, Y., J. Liu, C. Liu, A. Naji, y D. a. Stoffers. 2013a. MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic b-cells. *Diabetes*. 62:887-895.
- Wang, Y., R. Medvid, C. Melton, R. Jaenisch, y R. Blelloch. 2007. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 39:380-5.
- Wang, Y., C. Melton, Y.-P. Li, A. Shenoy, X.-X. Zhang, D. Subramanyam, y R. Blelloch. 2013b. miR-294/miR-302 promotes proliferation, suppresses G1-S restriction point, and inhibits ESC differentiation through separable mechanisms. *Cell Rep.* 4:99-109.
- Warnock, G.L., D.M. Thompson, R.M. Meloche, R.J. Shapiro, Z. Ao, P. Keown, J.D. Johnson, C.B. Verchere, N. Partovi, I.S. Begg, M. Fung, S.E. Kozak, S.O. Tong, K.M. Alghofaili, y C. Harris. 2008. A multi-year analysis of islet transplantation compared with intensive medical therapy on progression of complications in type 1 diabetes. *Transplantation*. 86:1762-6.
- Warrander, F., L. Faas, O. Kovalevskiy, D. Peters, M. Coles, A.A. Antson, P. Genever, y H. V Isaacs. 2016. lin28 proteins promote expression of 17~92 family miRNAs during amphibian development. *Dev. Dyn.* 245:34-46.
- Wei, R., J. Yang, G.-Q. Liu, M.-J. Gao, W.-F. Hou, L. Zhang, H.-W. Gao, Y. Liu, G.-A. Chen, y T.-P. Hong. 2013. Dynamic expression of microRNAs during the differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Gene*. 518:246-55.
- Weissman, I.L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100:157-68.
- Weissman, I.L. 2002. Stem cells--scientific, medical, and political issues. *N. Engl. J. Med.* 346:1576-9.
- Wellner, U., J. Schubert, U.C. Burk, O. Schmalhofer, F. Zhu, A. Sonntag, B. Waldvogel, C. Vannier, D. Darling, A. zur Hausen, V.G. Brunton, J. Morton, O. Sansom, J. Schöler, M.P. Stemmler, C. Herzberger, U. Hopt, T. Keck, S. Brabletz, y T. Brabletz. 2009. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 11:1487-95.
- WHO Study Group. 1985. World Health Organization: Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. *World Heal. Org.* 727:(Tech. Rep. Ser., 727).
- Wiater, E., y W. Vale. 2012. Roles of activin family in pancreatic development and homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 359:23-9.
- Wienholds, E., W.P. Kloosterman, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Berezikov, E. de Bruijn, H.R. Horvitz, S. Kauppinen, y R.H. a Plasterk. 2005. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*. 309:310-11.
- Wightman, B., I. Ha, y G. Ruvkun. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4

- mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75:855-62.
- Wing, R.R., E.H. Blair, P. Bononi, M.D. Marcus, R. Watanabe, y R.N. Bergman. 1994. Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. *Diabetes Care*. 17:30-6.
- Wolfrum, C., D. Besser, E. Luca, y M. Stoffel. 2003. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:11624-9.
- Wong, R.C.-B., P.J. Donovan, y A. Pébay. 2011. Molecular mechanism involved in the maintenance of pluripotent stem cells. *J. Stem Cells*. 6:213-32.
- Wu, S.M., y K. Hochedlinger. 2011. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat. Cell Biol.* 13:497-505.
- Van Wynsberghe, P.M., S.-P. Chan, F.J. Slack, y A.E. Pasquinelli. 2011. Analysis of microRNA expression and function. *Methods Cell Biol.* 106:219-52.
- Xiao, L., X. Yuan, y S.J. Sharkis. 2006. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 24:1476-86.
- Xu, G., J. Chen, G. Jing, y A. Shalev. 2013. Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. *Nat. Med.* 19:1141-6.
- Xu, N., T. Papagiannakopoulos, G. Pan, J. a. Thomson, y K.S. Kosik. 2009. MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*. 137:647-58.
- Xu, R.-H., R.M. Peck, D.S. Li, X. Feng, T. Ludwig, y J.A. Thomson. 2005. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat. Methods*. 2:185-90.
- Xu, X., V.L. Browning, y J.S. Odorico. 2011. Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. *Mech. Dev.* 128:412-27.
- Yamakuchi, M., M. Ferlito, y C.J. Lowenstein. 2008. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:13421-6.
- Yamamoto, M., Y. Saijoh, A. Perea-Gomez, W. Shawlot, R.R. Behringer, S.-L. Ang, H. Hamada, y C. Meno. 2004. Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo. *Nature*. 428:387-92.
- Yang, R., J.L. Kerschner, y A. Harris. 2016. Hepatocyte nuclear factor 1 coordinates multiple processes in a model of intestinal epithelial cell function. *Biochim. Biophys. Acta*. 1859:591-8.
- Yang, T., Y. Liang, Q. Lin, J. Liu, F. Luo, X. Li, H. Zhou, S. Zhuang, y H. Zhang. 2013. miR-29 mediates TGFβ1-induced extracellular matrix synthesis through activation of PI3K-AKT pathway in human lung fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 114:1336-42.
- Yi, R., y E. Fuchs. 2011. MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells. *J. Cell Sci.* 124:1775-83.
- Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara, y B.R. Cullen. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17:3011-6.
- Yu, J., M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I.I. Slukvin, y J.A. Thomson. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318:1917-20.
- Yuan, H., N. Corbi, C. Basilico, y L. Dailey. 1995. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9:2635-45.

-
- Zahn, H., O. Brinkhoff, J. Meienhofer, E.F. Pfeiffer, H. Ditschuneit, y C. Gloxhuber. 1965. Combining of synthetic insulin chains into biologically active preparations. *Zeitschrift fur Naturforschung. Tl. B, Chemie, Biochem. Biophys. Biol. und verwandte Gebiete*. 20:666-70.
- Zaret, K.S. 2001. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:568-74.
- Zaret, K.S. 2002. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 3:499-512.
- Zeller, K.I., X. Zhao, C.W.H. Lee, K.P. Chiu, F. Yao, J.T. Yustein, H.S. Ooi, Y.L. Orlov, A. Shahab, H.C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, V.A. Kuznetsov, W.-K. Sung, Y. Ruan, C. V Dang, y C.-L. Wei. 2006. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:17834-9.
- Zeng, Y. 2006. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 25:6156-62.
- Zhang, D., W. Jiang, M. Liu, X. Sui, X. Yin, S. Chen, Y. Shi, y H. Deng. 2009. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res.* 19:429-38.
- Zhang, Y.-Q., H. Zhang, A. Maeshima, H. Kurihara, J.-I. Miyagawa, T. Takeuchi, y I. Kojima. 2002. Up-regulation of the expression of activins in the pancreatic duct by reduction of the beta-cell mass. *Endocrinology*. 143:3540-7.
- Zhao, C., G. Sun, S. Li, y Y. Shi. 2009. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:365-71.
- Zhao, X., R. Mohan, S. Özcan, y X. Tang. 2012. MicroRNA-30d induces insulin transcription factor MafA and insulin production by targeting mitogen-activated protein 4 kinase 4 (MAP4K4) in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 287:31155-64.
- Zhou, a-D., L.-T. Diao, H. Xu, Z.-D. Xiao, J.-H. Li, H. Zhou, y L.-H. Qu. 2012. β -Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/ β -catenin-signaling pathway. *Oncogene*. 31:2968-78.
- Zhou, R., G. Hu, J. Liu, A.-Y. Gong, K.M. Drescher, y X.-M. Chen. 2009. NF-kappaB p65-dependent transactivation of miRNA genes following *Cryptosporidium parvum* infection stimulates epithelial cell immune responses. *PLoS Pathog.* 5:e1000681.
- Zhu, Y., W. You, H. Wang, Y. Li, N. Qiao, Y. Shi, C. Zhang, D. Bleich, y X. Han. 2013. MicroRNA-24/MODY gene regulatory pathway mediates pancreatic β -cell dysfunction. *Diabetes*. 62:3194-206.
- Zimmet, P.Z. 1992. Kelly West Lecture 1991. Challenges in diabetes epidemiology--from West to the rest. *Diabetes Care*. 15:232-52.
- Zorn, A.M., y J.M. Wells. 2009. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25:221-51.